

「海産魚類数種の初期発生過程における
活性酸素種産生に関する生化学的研究」

Studies on The Production of Reactive Oxygen Species (ROS)
During the Early Development Stage of Various Marine Fish
Species

2007 年 12 月

長崎大学大学院生産科学研究科

門村 和志

目 次

第1章 緒 論	1
第2章 オニオコゼおよびカサゴ仔魚の初期生残率に及ぼす抗酸化物質の添加効果	5
第3章 海産魚6種の仔魚による活性酸素産生	23
第4章 オニオコゼ胚および仔魚による活性酸素産生	34
第1節 オニオコゼ胚による活性酸素産生	34
第2節 へい死発生時の仔魚の活性酸素産生レベル	44
第5章 ウエスタンブロッティングによるNADPH oxidaseの検出	49
第6章 総合考察	55
摘 要	60
謝 辞	63
参考文献	64
Summary	70

第1章 緒 論

近年、「マグロが食卓から消える」などの衝撃的な見出しが新聞、報道でしばしば見られるが、国内での関心が高いマグロ類以外にも水産物の国際市場ではかつてなかったような輸入競争が発生、国際価格の上昇により日本の輸入業者が購入できず他国に取られてしまういわゆる「買い負け」現象が起き始めているなど世界の水産物需給には大きな構造変化が起きている。¹⁾

これらの現象は、BSE や鳥インフルエンザ発生に端を発した消費者の食肉不安や健康への関心の高まりによる欧米における肉食から魚食への需要シフト、また中国における急速な経済発展による消費量増大などによる世界的な水産物需要の増大が背景にある。

このような水産物需要の増大とは裏腹に、世界の水産物生産量は頭打ちの傾向にある。中でも漁業資源については FAO（国際連合食糧農業機関）がその資源量を分析・評価している魚種のうち実に 77%が持続可能な最大限度生産レベル以上の利用を行っていると報告しているように、今後増産を期待するのは難しい状況にある。²⁾

一方で養殖業は未だに世界で最も目覚ましい成長を遂げている食産業であり、今後の増産は養殖業によって担われると予測される。

今後 50 年で 1.5 倍になると予測される世界人口の増加とあいまって水産物需要はさらに増え、2015 年には世界の需給ギャップは 1000 万トンにも達し、価格は上昇、激しい水産物奪い合いの時代の到来が予測されている。

そのような中、水産物の安定供給はより重要度を増している状況にあり、限られた水産資源を持続的に利用していくための資源管理および有用種を積極的に増産する養殖業への期待が高まっている。

わが国の栽培漁業の歴史は古く 1963 年（昭和 38 年度）に始められた（社）瀬戸内海栽

培漁業協会によるマダイの種苗生産・放流事業に始まる。以降 40 数年の間に対象魚種、生産尾数とも大きく増え、2005 年（平成 17 年度）に日本全国で種苗生産された人工種苗は放流用種苗として 36 魚種 8, 730 万尾、また養殖用種苗として 22 魚種 4, 830 万尾にも達している。³⁾

オニオコゼ *Inimicus japonicus* は本州中部以南の砂泥底に生息するカサゴ目オニオコゼ科の魚類で、淡白な白身で刺身、唐揚げ、鍋物などで非常に美味であるため、5, 000 円/kg 程度の高値で取引される高級魚である。放流後の定着性が高いことから種苗放流の要望が多く、栽培漁業の有望種として期待される魚種の 1 つである。そのため西日本を中心に多くの府県水産試験場や栽培漁業センターなどで種苗生産の技術開発が行われており、2006 年度には 13 府県 20 機関で、過去に行われたものも含めると実に 19 府県で取り組まれているわが国の水産上重要種である。また単価が非常に高い高級魚であるため、養殖魚としての可能性も期待され、いくつかの養殖試験に関する報告も行われている。⁴⁻⁷⁾ このような背景から、オニオコゼ人工種苗の安定生産が求められているが、本種の種苗生産にはふ化後 10 日目頃までの飼育初期の着底前後の 2 つの時期に特徴的な大量へい死が発生し、その生産は決して安定していない。これらの大量へい死の原因として卵質⁸⁾、感染症⁹⁾などが候補として考えられているものの、正確な原因はいまだ明らかにされていない。

カサゴ *Sebastes marmoratus* はカサゴ目フサカサゴ科の魚類で、北海道から東シナ海に分布し、潮間帯から水深 80m 付近までの比較的潮流の早い岩礁、転石帯などの磯根に生息する。放流後の移動が少なく定着性が高いことから、オニオコゼと同様に栽培漁業対象種として期待される魚種の 1 つである。2005 年には全国で 247 万尾³⁾が生産されているが、本種もその種苗生産過程においてオニオコゼと類似した大量へい死を起こす場合がある。これらの大量へい死は経験的に漁獲直後や産仔後期¹⁰⁾の親魚を用いた場合に起こりやすいことが知られているが、オニオコゼと同様に現在でも正確なへい死原因は明らかでな

い。前述のとおり全国で 200 万尾以上もの人工種苗が生産されていることから、安定的な生産技術が確立したかのように捉えられがちであるが、実際には現在でもカサゴの大量へい死はしばしば発生しており、各県の栽培漁業センターなど生産ノルマを持つ生産機関にとっては依然として深刻な課題であり、その解決が望まれているところである。¹¹⁻¹³⁾

フリーラジカル、特にスーパーオキシド (O_2^-) やヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、およびその他の活性酸素種 (ROS : Reactive Oxygen Species)、例えば過酸化水素 (H_2O_2) 等が水生生物の生体内で絶えず発生していることは既に一般に知られている。

これらの活性酸素に対する防御系として生体には各種の抗酸化物質、例えば水溶性のビタミンC (アスコルビン酸) や還元型グルタチオン (GSH)、脂溶性のカロテノイド、ビタミンE、ビタミンA等が利用されているとともに、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) やカタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) 等の抗酸化酵素が存在し通常は活性酸素の生成と消去のバランスを取っている。^{14, 15)} しかし高水温など種々の環境ストレス下では活性酸素が発生しやすく、^{14, 16)} 生成と消去のバランスが何らかの原因で崩れた場合、生体の防御力を超えて発生した過剰な活性酸素が蛋白質、細胞膜、DNA等を酸化し重大な損傷を与えることがニジマス *Oncorhynchus mykiss*,¹⁷⁾ ブラウントラウト *Salmo trutta*,¹⁸⁾ スマガレイ属の一種 *Platichthys flesus*,¹⁹⁾ ムラサキイガイ *Mytilus edulis*,²⁰⁾ エビジャコ的一种 *Crangon crangon*,²¹⁾ 海綿の一種 *Microciona prolifera*²²⁾ など多くの生物種で報告されている。シマアジ *Pseudocaranx dentex* においては、多回産卵や高密度収容が親魚群にとってストレスとなるとの報告²³⁾ があることから、大量へい死を起こしやすいとされる漁獲直後や産仔後期のカサゴ親魚は著しいストレス状態に置かれていることが推察される。このようなカサゴの大量へい死が飼育水へのアスコルビン酸添加により顕著に抑制できるとの興味深い報告がある。²⁴⁾

著者はアスコルビン酸の高い抗酸化作用に着目し、飼育水に添加したアスコルビン酸の

ラジカルスカベンジャーとしての作用が過剰な活性酸素による生体へのダメージを抑えた結果、へい死を抑制していると推論した。しかし仔魚の活性酸素産生に関する報告はきわめて少ない。

以上の背景から本研究では海産魚類仔魚の活性酸素産生と初期生残率に関する基礎的知見の集積を試みた。

ここまで述べてきた第1章に続き、第2章では上記仮説を確かめる目的でオニオコゼおよびカサゴを用いて飼育水への抗酸化物質添加試験を行い、仔魚のへい死抑制効果について調べた。第3章では化学発光法によりオニオコゼ、カサゴのほかメバル、マハタ、トラフグ、マダイの計6魚種について仔魚期における活性酸素産生を検出し、その産生レベルを比較した。第4章ではオニオコゼの胚および仔魚による活性酸素産生について詳細に調べ、初期生残率との関係について考察した。第5章ではオニオコゼ胚期の活性酸素産生系についてウェスタンブロッティングを用いた発現解析によりNADPH oxidaseの挙動について調べた。第6章では2～5章での結果を踏まえ、海産魚類仔魚による活性酸素産生とその生物学的意義および種苗生産技術への応用に関する展望について述べた。

第2章 オニオコゼおよびカサゴ仔魚の初期生残率に及ぼす抗酸化物質の添加効果

オニオコゼは有望な栽培漁業対象種としての期待が高いことから、種苗の大量生産が求められている魚種であるが、本種の種苗生産は飼育初期に発生する大量へい死のために安定していない。^{8,9)} またカサゴも種苗生産の要望が高く、各地で種苗生産の取り組みが進められている魚種であるが、本種も飼育初期に大量へい死発生によって飼育中止に追い込まれる場合があり、生産現場ではその原因究明と防除策の確立が望まれている。¹⁰⁻¹³⁾

カサゴの大量へい死防除については、飼育水へのアスコルビン酸添加によりカサゴ仔魚の初期生残率が顕著に向上するとの興味深い報告がある。²⁴⁾ この中ではへい死抑制のメカニズムは明らかにされていないが、著者はアスコルビン酸の抗酸化作用が仔魚の生残率を向上させ得るのではないかと考えた。他方、アスコルビン酸の添加には、飼育水 pH を急激に低下させるほか、アスコルビン酸分解物により飼育水中に粘性を帯びたバクテリアフロックが出現し、飼育水槽の水質維持の観点からはあまり好ましくない状況に陥る側面もある。²⁵⁾

そこで本研究では、アスコルビン酸よりも分解されにくく安定的なアスコルビン酸誘導体 (L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム塩 *n* 水和物 ; APM) ^{26,27)} や高い抗酸化活性を持つことで知られるカテキン ^{28,29)} を豊富に含む市販の緑茶抽出物を用いて、飼育水へのこれら抗酸化物質の添加によりオニオコゼ、カサゴ仔魚の大量へい死を抑制できるか否かを飼育実験により検証した。

材料および方法

供試魚と実験条件 実験日および供試材料などを Table 1 に示した。オニオコゼについて緑茶抽出物の添加効果を小規模実験（実験 1, 2）および稚魚生産を目標とした通常の種苗生産規模（実験 3, 4）でも検証した。また緑茶抽出物の毎日および隔日添加，さらに APM との比較を小規模実験で行った（実験 5）。

またカサゴについては緑茶抽出物の添加効果（実験 6）および緑茶抽出物と APM との比較（実験 7）を行った。

オニオコゼ受精卵は産卵前の天然魚を用いた人工授精（実験 1）およびホルモン誘発産卵（実験 2）により得た。³⁰⁾ 受精卵は 1 kI アルテミアふ化槽を用いて卵管理を行った後，ふ化前の卵を飼育水槽へ均等に収容した。実験 3, 4 は岡山県水産試験場栽培漁業センターで採卵し，輸送中にふ化したふ化仔魚，また実験 5 は佐賀県玄海水産振興センターで採卵し輸送した卵を使用した。

カサゴは長崎県総合水産試験場の海面筏で飼育した養成親魚から自然産仔（実験 6）により得た仔魚，または腹部の膨れた産仔直前と思われる天然魚を購入し切開法（実験 7）により得た仔魚を均等に飼育水槽へ収容した。

飼育方法 オニオコゼの飼育水槽は 500 l 黒色ポリエチレン水槽（直径 117 cm，深さ 77 cm），6 kI 角型コンクリート水槽（1.8×2.8×1.3 m；実水量 5 kI）および 8 kI 角型コンクリート水槽（1.8×3.8×1.3 m；実水量 7 kI）を用いた。紫外線照射海水を換水率 100—200 % / 日で注水し，ポリエチレン製メッシュスクリーン（MS40 目；オープニング 526 μm）で作製したアンドンをを用いて排水した。500 l 水槽は中央にエアストーン（直径 50 mm）1 個を，角型コンクリート水槽は 4 辺に対角となるようエアブロック（ユニホース：直径 25 mm×長さ 1 m）を設置し飼育水を攪拌した。餌料系列は開口から L 型ワムシ *Brachionus plicatilis* を 5～10 個/mI，全長 6 mm を目安にアルテミア *Artemia* sp. のノープリウス幼生を 0.2 個

Table1 Rearing condition in each experiment.

Expt. No.	Fish species	Date	Tank (kl)	Antioxidant agent	Additive amount (g/ tank)	Interval	Flow rate (%/day)	Rearing period	Water temperature (°C)
1	devil stinger	2003.5.25	0.5	30A 90S	0.5 0.1	everyday	200	15days	19.3-22.7
2	devil stinger	2003.6.27	0.5	30A 90S	0.5 0.1	everyday	200	7days	23.7-24.7
3	devil stinger	2004.7.2	5	30A	5	everyday	100	10days	25.2-28.1
4	devil stinger	2004.7.2	7	30A	7	everyday	100	15days	24.3-26.2
5	devil stinger	2001.7.27	0.5	APM 90s 90s	10 0.1 0.1	everyday everyday alternate day	100	7days	26.8-29.0
6	marbled rockfish	2001.3.27	0.5	30A 30A	0.5 0.1	everyday	200	7days	13.2-15.9
7	marbled rockfish	2002.4.10	0.5	APM 30A 90S	10 0.5 0.1	everyday	200	10days	15.1-17.4

/mIの密度で1日1回給餌し、摂餌状況を観察しながら仔魚の成長に伴い給餌量を増加した。これら生物餌料は市販の栄養強化剤を用いて栄養強化を行った。飼育水には自家製濃縮ナノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* を $5\sim 10\times 10^5$ cells/mIになるよう1日1回添加した。発育段階の違いによりへい死時期がずれるか否かを確認する目的で実験3に加温区（Cont.2：自然水温+2℃）を設定したほかには、飼育水温の調整は行わず自然水温で飼育を行った。また、照度の調整は特に行わなかった。

カサゴは500 l黒色ポリエチレン水槽を使用し、注水、通気、餌料系列など基本的な飼育方法はオニオコゼと同様に飼育した。

成長は原則として0, 3, 5, 7, 10, 15日令に飼育水槽から無作為に仔魚をサンプリングし、MS222で麻酔後、万能投影機（VP-300D TOPCON 社製）を用いて10-20個体の全長を測定した。生残率は原則として0, 3, 5, 7, 10, 15日令に夜間の柱状サンプリング法により推定した。本研究では飼育初期、概ね10日令までの大量へい死に的を絞り実験期間は最大15日令までと設定したが、対照区で大量へい死が発生した場合は、その時点で実験区の生残尾数を測定し実験を終了した。

抗酸化物質 茶カテキンとして市販されている緑茶抽出物（「テアフラン 30A」（以下、30A）および「テアフラン 90S」（以下、90S）；（株）伊藤園）とAPM（和光純薬工業）を用いた。30Aと90Sは茶葉の熱水抽出物を高速液体クロマトグラフィー法でカラムに吸着させることにより分離・製造され、総ポリフェノール含有量はそれぞれ30%以上、90%以上である。30A、90Sの商品規格をTable 2に示した。

飼育水への抗酸化物質の添加は、飼育水量1kIあたりの添加量を30Aは1 gまたは0.2 g、90Sは0.2 g、APMは20 gとして蒸留水1 lに溶解させた水溶液を、アルミホイルで遮光した点滴瓶を用いることにより1日1回、2～4時間かけて滴下した。実験3、4では各水溶液1 lを直接飼育水槽に毎日添加した。実験5では90Sについて毎日添加区と隔日添加区

Table 2 Specification of green tea extract used in this study

Grade	THEA-FLAN 30A	THEA-FLAN 90S
Description	A light green to yellowish brown powder having a characteristic odor and taste	A yellowish brown to red brown powder having a characteristic odor and taste
Total Polyphenols	min. 30%	min. 90%
Epigallocatechin gallate (EGCg)	min. 10%	min. 40%
Caffein	-	not more than 1%
Loss on drying	not more than 6%	not more than 6%
Residue on ignition	not more than 15%	not more than 5%
pH (1% sol.)	5.0-6.0	4.5-5.5
Standard plate count per gram	not more than 3000	not more than 3000
Coliforms	Negative	Negative
Arsenic (As ₂ O ₃)	not more than 2ppm	not more than 2ppm
Heaby metals (as Pb)	not more than 20ppm	not more than 20ppm

を設けた。いずれの実験でも対照区には蒸留水 1 l を同様の方法で添加した。

生菌数測定 飼育水に添加した緑茶抽出物の主成分である茶カテキンの代表的な生理作用の 1 つとして抗菌効果がある。本研究における添加濃度でカテキンによる抗菌効果を確認する目的で、実験 3, 4 においてコロニー法による生菌数測定を行った。培地は Marine agar2216 と TCBS 培地を用いて、25 °C、120 時間の培養の後コロニーを計数した。

結 果

オニオコゼを用いた実験 1～5 の生残率を Fig.1 に示した。実験 1 では全滅に至るほどの大量へい死は発生しなかったものの 15 日令における生残率は対照区の 15.5%, 17.0% に対し 30A 添加区で 34.5 %, 90S 添加区で 42.6% といずれも緑茶抽出物添加区で高かった。実験 2 では 5 日令および 7 日令に対照区で大量へい死が発生し全滅したため実験を終了した。7 日令における生残率は対照区 0% に対し 30A 添加区が 82.8%, 90S 添加区が 54.3% といずれも顕著に高かった。また稚魚生産を目標として生産規模で行った実験 3 では 9 日令に対照区で大量へい死が発生したため、10 日令で実験を終了した。10 日令における対照区生残率 1.9%, 2.0% に対し 30A 添加区は 55.3% と顕著に高かった。なお対照区の 1 方は自然水温+2°C の加温を行っていたが、大量へい死発生の時期、程度に自然水温区との差はなく、加温による影響は見られなかった。実験 3 と同じ卵を用いて行った実験 4 では 10 日令まで大きなへい死は見られなかったが、12 日令に対照区で大量へい死が発生し全滅した。15 日令における生残率は対照区 0% に対し 30A 添加区 40.0% と顕著に高かった。なお実験 3, 4 の 30A 添加区は 15 日令で緑茶抽出物の添加を終了した後も飼育を継続し、20 日令までに着底魚 1.7 万尾を取り上げた。緑茶抽出物 90S の毎日添加と隔日添加さらに APM との比較を行った実験 5 では、程度は軽微であったものの 5 日令から 7 日令にかけて

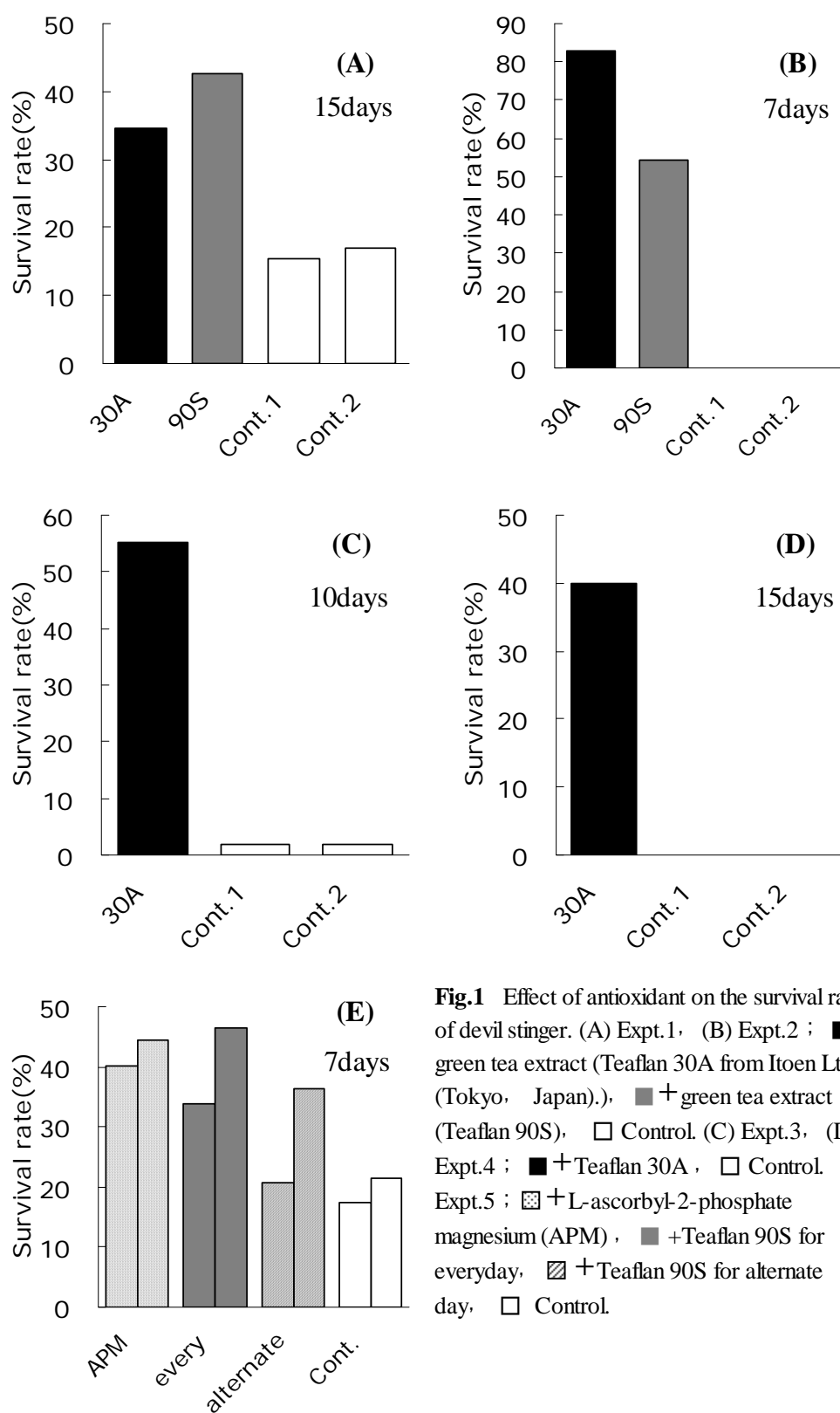


Fig.1 Effect of antioxidant on the survival rate of devil stinger. (A) Expt.1, (B) Expt.2 ; ■ + green tea extract (Teaflan 30A from Itoen Ltd (Tokyo, Japan).), ■ + green tea extract (Teaflan 90S), □ Control. (C) Expt.3, (D) Expt.4 ; ■ + Teaflan 30A, □ Control. (E) Expt.5 ; ▨ + L-ascorbyl-2-phosphate magnesium (APM), ■ + Teaflan 90S for everyday, ▨ + Teaflan 90S for alternate day, □ Control.

対照区でへい死が発生し、7日令における生残率は対照区の17.5%、21.4%に対しAPM添加区では40.1%、44.4%と顕著に高かった。また7日令における毎日添加区の生残率は46.4%、33.9%、隔日添加区では36.3%、20.7%と、隔日添加区は毎日添加区およびAPM添加区には及ばないものの、対照区よりも若干高かった。

また実験期間中の仔魚の成長については3回次において加温区の成長が早く、5日令以降成長差が見られたものの、大量へい死の発生した9日令時点では緑茶抽出物添加区に追いつかれた。その他は、いずれの実験においても各区の仔魚の成長に差は見られなかった(Fig.2)。

また実験3, 4において飼育水中の生菌数を比較した結果、Fig.3, 4, 5, 6に示したように一般細菌およびビブリオ属細菌ともに緑茶抽出物添加区と対照区との間に差は見られなかった。

次にカサゴを用いて行った実験6, 7の生残率をFig.7に示した。実験6では緑茶抽出物との比較のためAPM添加区を設けた。対照区では大量へい死が発生し9日令で全滅したが、試験区では発生せず10日令における各区の生残率は対照区の0%に対し、30A添加区が83.2%、90S添加区が67.0%、そしてAPM添加区が74.2%とすべての試験区で顕著に高かった。実験7では緑茶抽出物30Aの添加量を1水槽あたり0.5gと0.1gの2段階設定した。6日令まではどの試験区でも目立ったへい死は起こらなかったが、7日令に対照区で大量へい死が発生したため実験を終了した。7日令における生残率は対照区の1.1%、9.5%に対し0.5g添加区は77.9%、63.9%、0.1g添加区は35.1%、72.9%と添加量により若干差があるものの、いずれも緑茶抽出物の添加区で顕著に高かった。またいずれの実験においても仔魚の成長に差は見られなかった(Fig.8)。

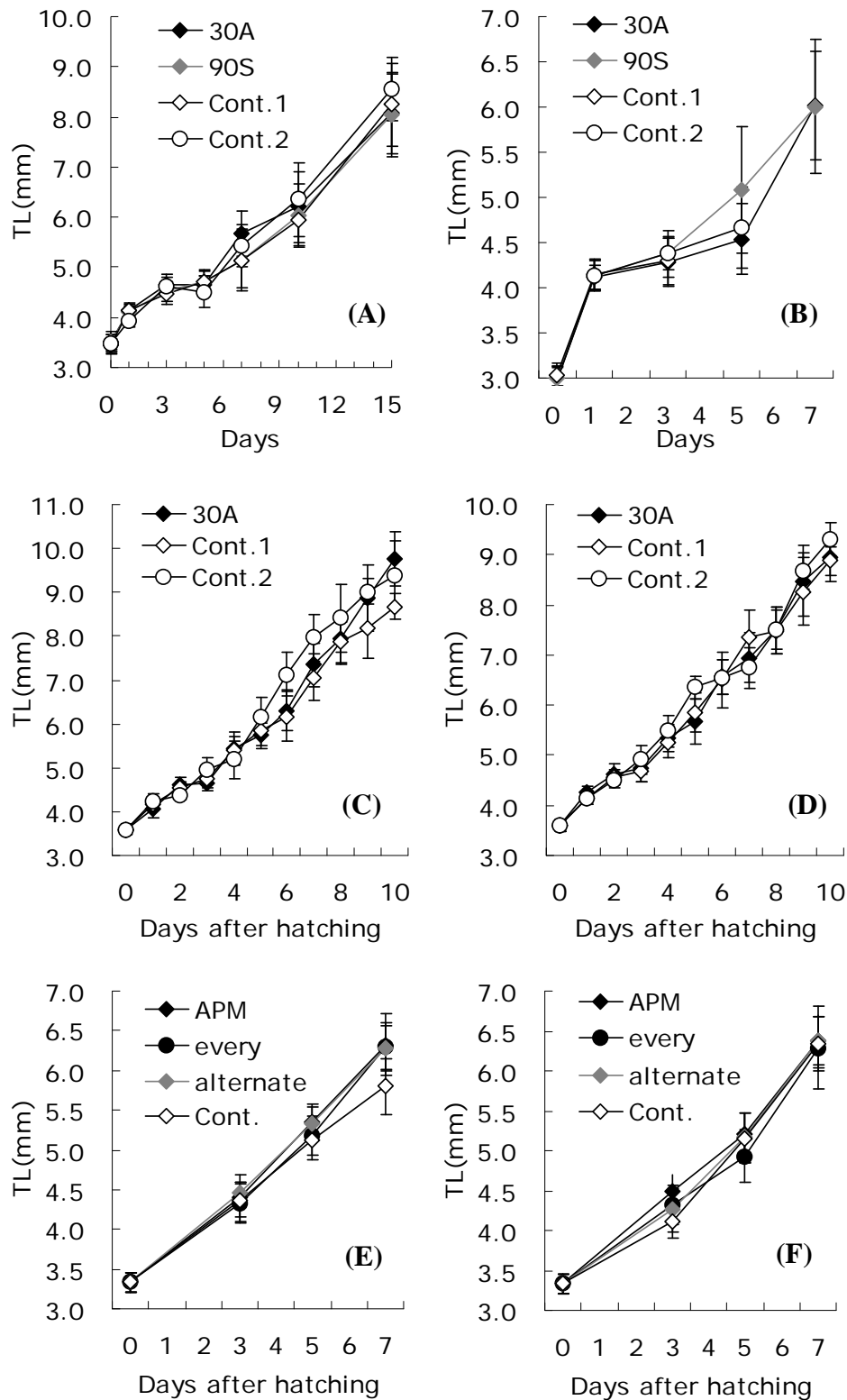


Fig.2 Growth of devil stinger at different days after hatching. Each plot and bar indicates average and standard deviation, respectively. (A) Expt.1, (B) Expt.2, (C) Expt.3, (D) Expt.4, (E) and (F) Expt.5.

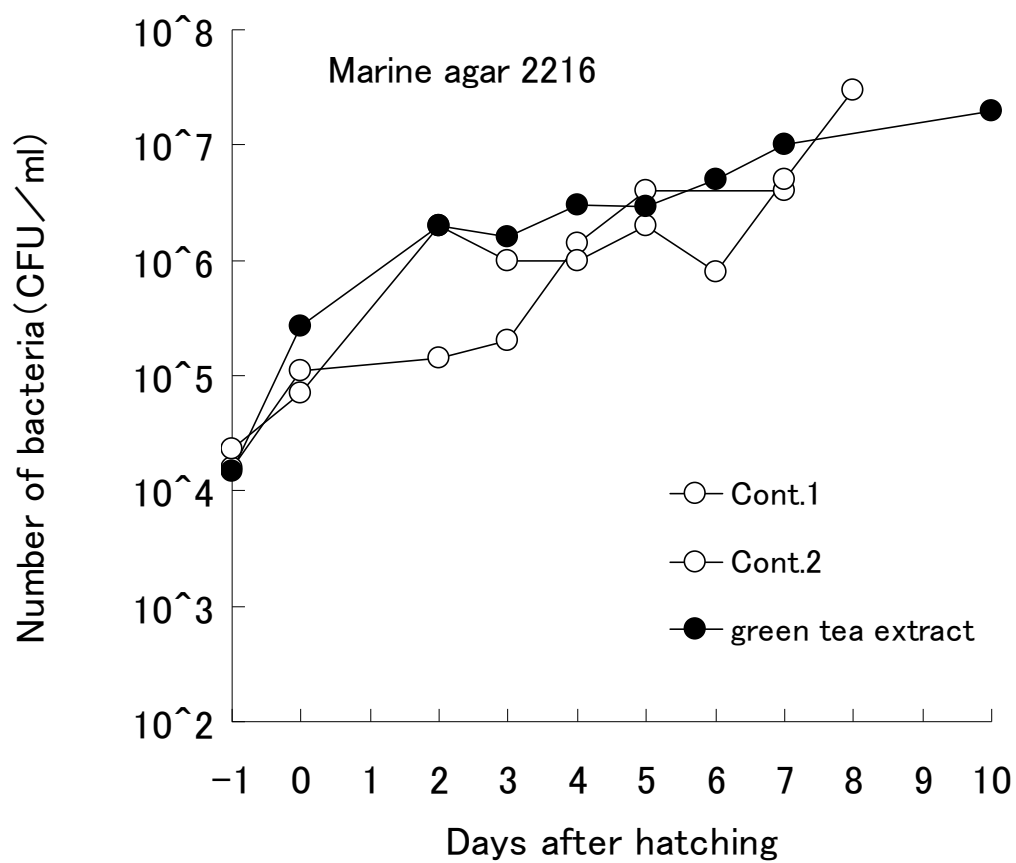


Fig.3 The number of bacteria in the rearing water by CFU assay with Marine agar 2216 medium.(Expt.3)

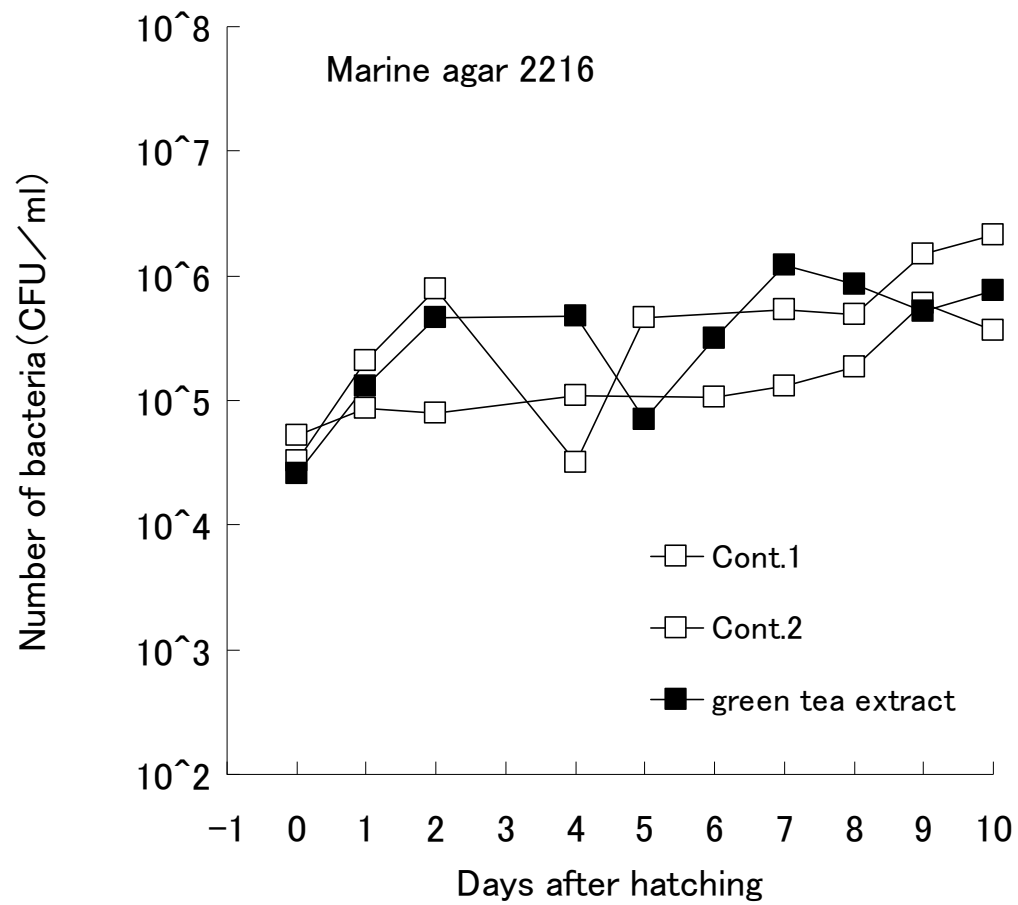


Fig.4 The number of bacteria in the rearing water by CFU assay with Marine agar 2216 medium.(Expt.4)

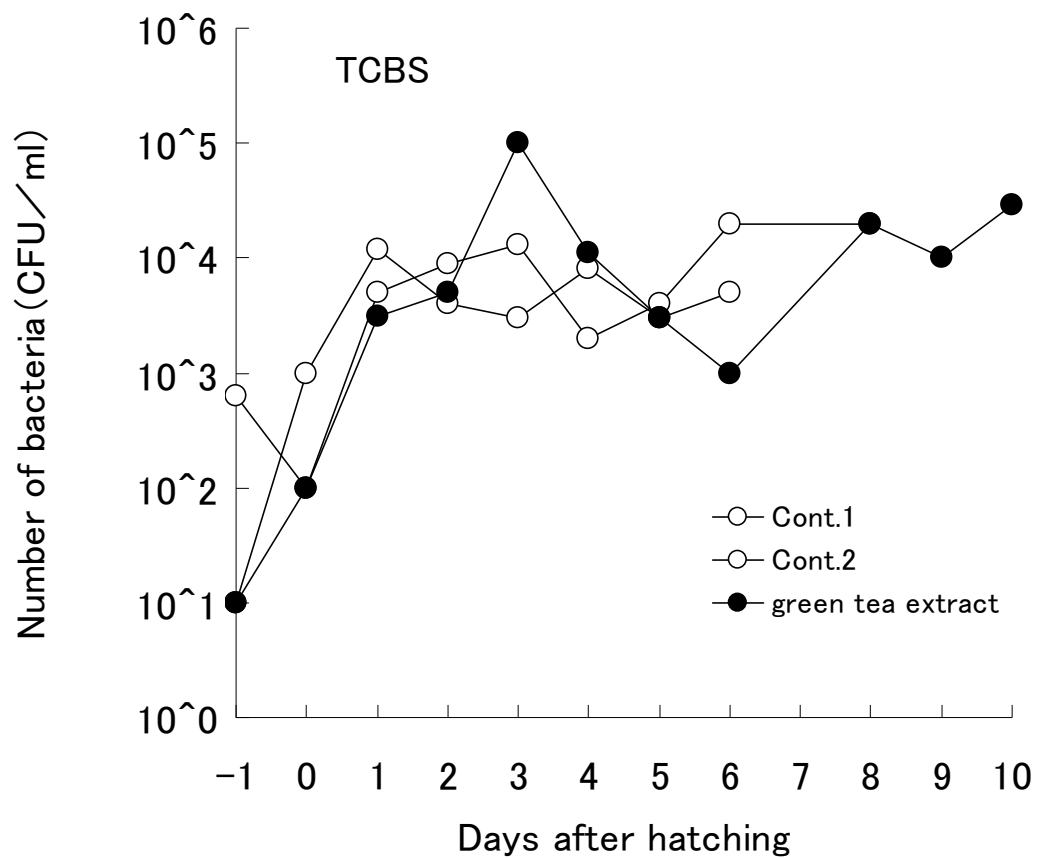


Fig.5 The number of bacteria in the rearing water by CFU assay with TCBS agar medium.(Expt.3)

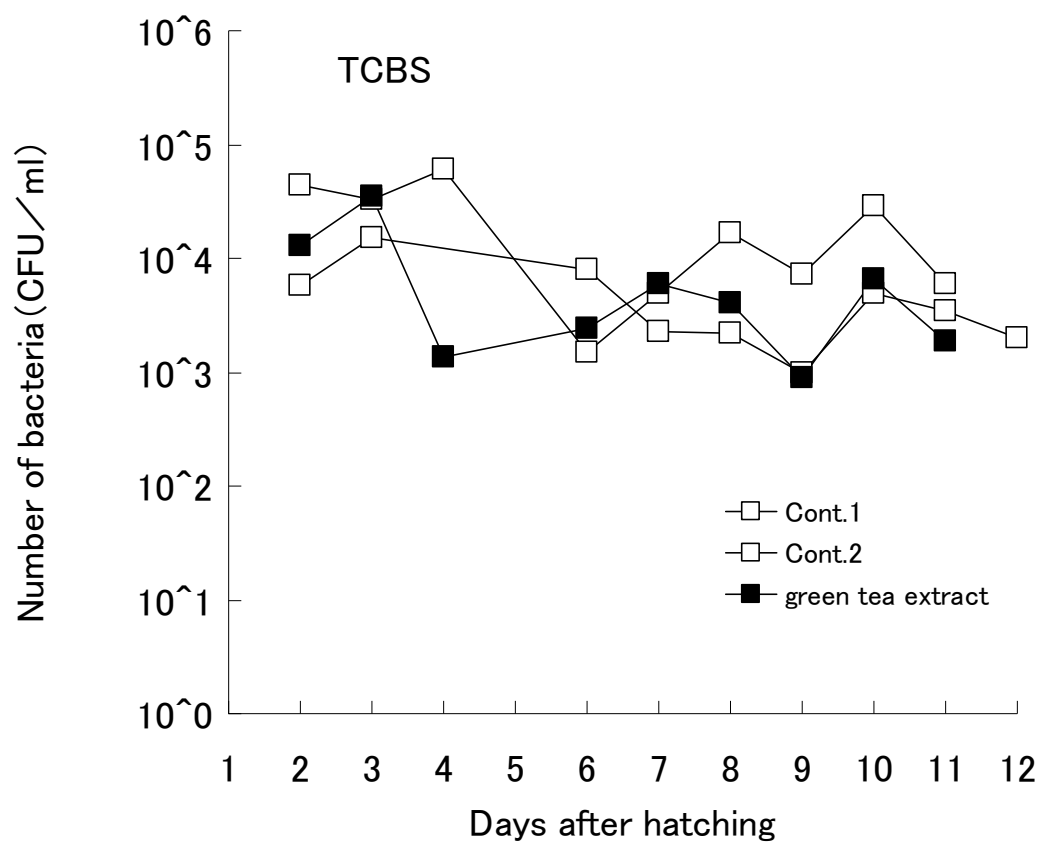


Fig.6 The number of bacteria in the rearing water by CFU assay with TCBS agar medium.(Expt.4)

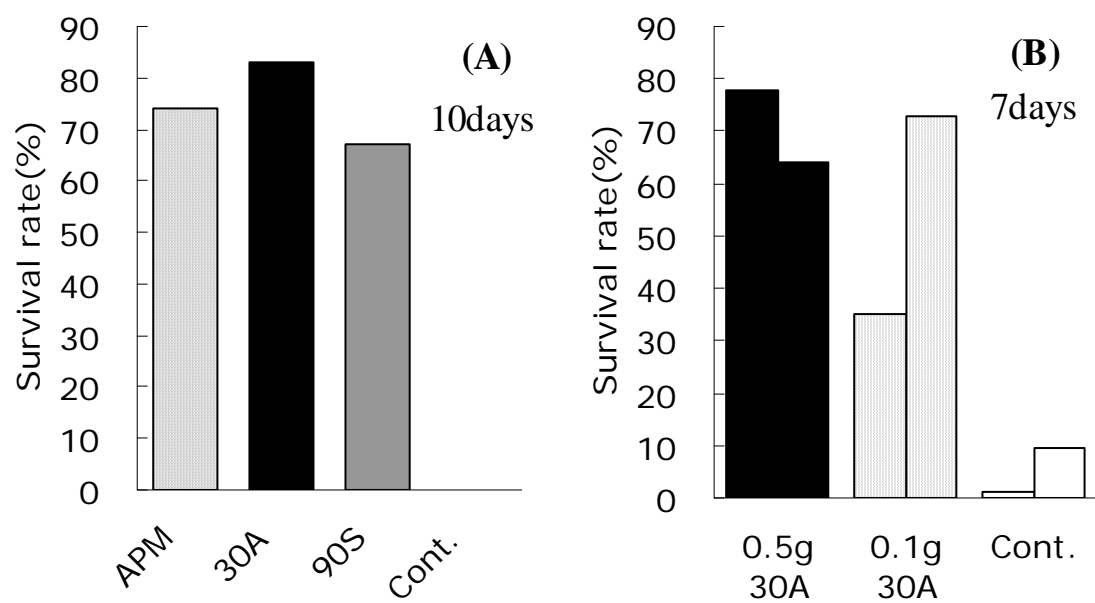


Fig. 7 Effect of antioxidant on the survival rate of marbled rockfish.

(A) Expt.6; ▨ +APM, ■ +Teaflan30A, ▩ +Teaflan90S, □ Control. (B) Expt.7; ■ +Teaflan30A 0.5g/day, ▨ +Teaflan30A 0.1g/day, □ Control.

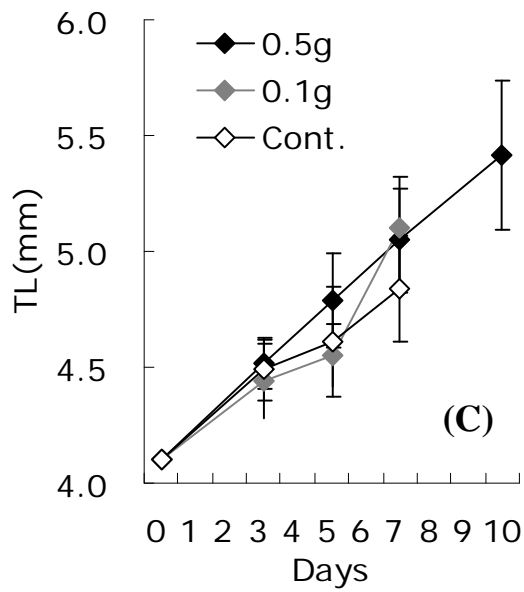
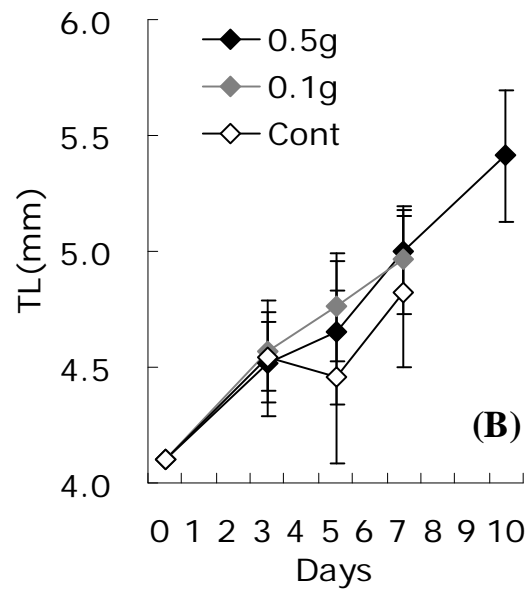
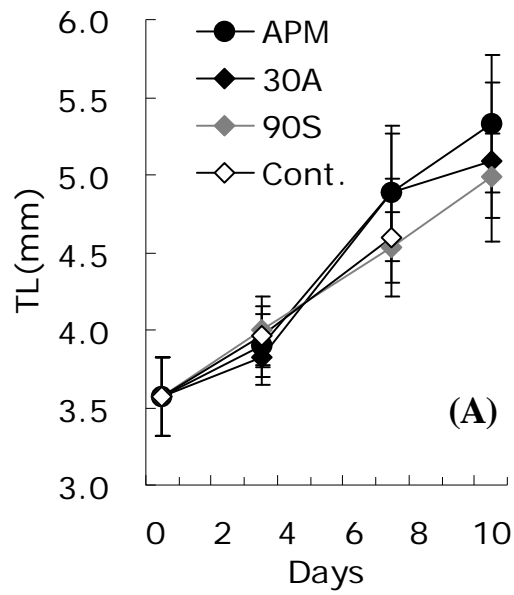


Fig. 8 Growth of marbled rockfish at different days after hatching. Each plot and bar indicates average and standard deviation, respectively. (A) Expt.6, (B) and (C) Expt.7.

考 察

カサゴ飼育水へのアスコルビン酸添加時に見られる飼育水 pH の急低下や、バクテリアフロックの出現等の仔魚の飼育管理を行う上で好ましくない性質の影響を排除するため、今回の試験ではアスコルビン酸の「抗酸化作用」に着目し、その代替として、より安定的で分解されにくいアスコルビン酸りん酸マグネシウム (APM) や、抗酸化力が高く、APM 等の試薬よりも入手が容易で安価な市販の緑茶抽出物を用いて、飼育水へのこれら抗酸化物質の添加が仔魚のへい死を抑制できるか否かについて調べた。

オニオコゼを用いた実験では Fig.1 に示すように、実験 1 では全滅に至るほどの大量へい死は発生しなかったが、実験 2~4 では発生した日令は実験回次ごとに異なるもののすべての回次において大量へい死が発生し、2 面設けていた対照区が同時期にそろってほぼ全滅した。それに対し各実験における緑茶抽出物の添加区は、その種類によらず全ての添加区でへい死は顕著に抑制され高い生残率を維持した。また実験 5 では緑茶抽出物と APM の 2 種類を用いて比較を行ったが、いずれも毎日添加した場合には対照区に比べ生残率は顕著に高く両者はほぼ同等、同様の効果を示したと考えられる。これらの結果はオニオコゼ仔魚の飼育水に緑茶抽出物または APM のいずれを添加してもへい死を顕著に抑制する効果があり、両者に共通する「抗酸化作用」がへい死抑制に関与している可能性を示している。また隔日添加区の生残率は毎日添加区と対照区とのちょうど中間程度であったことから、オニオコゼ仔魚のへい死抑制には緑茶抽出物の濃度依存的な影響が示唆されるが、この点に関しては飼育水中に存在している緑茶抽出物の濃度に関する詳細な分析、検討が必要であらう。

実験期間中の仔魚の成長については、実験 3 の加温区における成長が早く、無加温区との成長差が現れてきた 5 日令以降、平均全長の差は最大 0.956 mm に達しており、その差

は日令に換算すると 1-2 日分に相当すると考えられる (Fig.2)。しかし、加温区と無加温区における大量へい死の発生日や程度に差は見られなかった。このことは今回の大量へい死が成長差や発育ステージの違いを反映していない、すなわち仔魚内部の要因によるのではなく外部の要因、例えば餌料生物や飼育環境中に存在する細菌等を引き金として起きた可能性を示唆している。

一方で、カテキンによる抗菌効果については生菌数測定の結果、緑茶抽出物添加により見られた仔魚のへい死抑制効果は、カテキンの抗菌効果によるものではないことが明らかとなった (Fig.3,4,5,6)。本研究で使用した緑茶抽出物テアフランの製品資料によると、抗菌効果を期待した場合の使用量の目安はテアフラン 30A の場合、0.1-5%，90S の場合、0.05-0.3%とされている。飼育実験において想定されるそれぞれの最大瞬間濃度は 1 ppm および 0.2 ppm であるので、これらと比較すると本研究における添加濃度で抗菌効果が見られなかったのは当然の結果であると考えられる。

カサゴを用いた 2 回の実験でも、Fig.7 に示すように緑茶抽出物または APM 添加区の生残率は対象区に比較して顕著に高く、へい死抑制に関してオニオコゼの場合と同様の結果が得られた。また添加量を変えた実験 7 では、0.1 g 添加区の生残率は 0.5 g 添加区に比較して若干劣っており、カサゴの場合でも添加物の濃度依存的な影響のあることが示唆された。

仔魚の成長については実験期間中、各区に特に目立った差は認められず、今回の実験の添加量の範囲では成長に影響しないか、少なくとも悪影響を及ぼすことはないものと考えられる (Fig.8)。

なお本研究で用いた APM の価格は 50 g で 25,000 円、生産現場で実際に使用した場合、飼育水量 1kℓあたり 20 g 添加すると 5,000 円が毎日経費として上乗せされることになり、実用レベルでの使用は考えにくい。一方、緑茶抽出物 (テアフラン 30A およびテアフラン

90S ; いずれも (株) 伊藤園) の価格は、それぞれ 6,000 円/kg, 55,000 円/kg である。本研究と同じ添加割合で使用した場合、飼育水量 1 kIあたりの経費は 30A が 6 円, 90S が 11 円であり、緑茶抽出物の添加によるへい死抑制効果を考慮すれば、生産現場でも十分に使用可能な範囲であると考えられる。

本研究の結果が示すように、オニオコゼおよびカサゴ仔魚の大量へい死は緑茶抽出物や APM の添加により顕著に抑制されることから、両魚種は大量へい死に関して同一の原因を持っており、いずれも「抗酸化作用」が関与していると考えられる。このようなへい死原因の有力な候補の 1 つは活性酸素であろう。活性酸素は生体内では常に発生しているが、アスコルビン酸やビタミン E 等の抗酸化物質または SOD, カタラーゼ等の抗酸化酵素により通常は生成と消去のバランスを保ち生物は健康を維持している。^{14,15)} しかし種々のストレスが加わる条件下ではそのバランスを崩しやすく、^{14,16)} 生体の防御力を超えて過剰に発生した活性酸素が生体に様々なダメージを与えることは魚類¹⁷⁻¹⁹⁾ 以外にも多くの生物種²⁰⁻²²⁾で既に知られている。おそらく種苗生産における人為的に調整された飼育環境は仔魚にとって必ずしも快適ではなく、水温、照度、水流、飼育密度、水質、飼育水中の細菌などあらゆる飼育環境中の要素がストレス要因になりうると考えられる。不適な飼育環境に起因する過剰な活性酸素が仔魚に致死的なダメージを与えるとすれば、抗酸化物質の添加により大量へい死が抑制される現象について説明が可能になる。今後はオニオコゼおよびカサゴ仔魚について活性酸素産生の有無、その程度や過剰な活性酸素による組織障害の有無等について詳細な研究を行い、活性酸素とへい死との関わりについて明らかにすることが必要である。

第3章 海産魚6種の仔魚による活性酸素産生

最近の研究により、カテキンを豊富に含む緑茶抽出物の飼育水への添加によりオニオコゼ仔魚の生残率が向上することを見出し、活性酸素 (Reactive Oxygen Species: 以下, ROS) が大量へい死に関与している可能性を示したが、ROS 産生の起源およびその正確な理由は明らかになっていない。

カサゴ、メバル *Inermis japonicus* は日本ではどちらも商品価値の高い魚種であり、著者らを含むいくつかの水産試験場や栽培漁業センターがこれらの魚種の安定生産技術の確立に取り組んでいるところである。しかしながら、これらの魚種はしばしば飼育初期にオニオコゼと類似した大量へい死を起こすがその正確な原因はまだ解明されていない。^{10-13),31),32)} したがって、カサゴ、メバル、そしてその他の魚種の仔魚が発育初期段階でROSを産生するのか否かを調べることは興味深い。この観点から本研究では長崎県内で種苗生産が行われている水産上重要種のうちオニオコゼ、カサゴ、メバル、マハタ *Epinephelus septemfasciatus*, トラフグ *Takifugu rubripes*, マダイ *Pagrus major* の6魚種の仔魚について活性酸素の化学発光解析を行った。

材料および方法

仔魚 本研究では6種の海産魚類、オニオコゼ、カサゴ、メバル、マハタ、トラフグ、マダイについて調査した。オニオコゼは長崎県総合水産試験場の陸上水槽で養成中の親魚から自然産卵により得られた卵を用いた。カサゴは有明海から漁獲された産仔間近の天然親魚から自然産仔により仔魚を得た。メバルは長崎水試の海面生簀で養成中の親魚から自然産仔により仔魚を得た。マハタは長崎水試の海面生簀で養成した親魚から人工授精により

受精卵を得た。トラフグとマダイについては県内の民間種苗生産業者から受精卵を得た。

これらの卵および仔魚は飼育水槽に 5000-10000 尾/ kI の密度で収容し、紫外線殺菌海水を換水率 10-100%/日で注水した。実験期間中の飼育水温はオニオコゼで 20.7-21.3°C、カサゴ 14.8-16.2°C、メバル 15.3-16.3°C、マハタ 21.1-25.1°C、トラフグ 17.8-18.2°C、マダイ 16.3-18.4°C であった。餌料は L 型ワムシを市販の栄養強化剤で強化した後、仔魚の成長に応じて 5~15 個体/ mI になるよう 1 日 1 回給餌した。なお飼育水槽から定期的に 10-20 尾のサンプルをとり、MS222 で麻酔をかけ、万能投影機で体長を測定した。

化学発光解析 仔魚の ROS を検出するために高感度 ROS 特異的プローブ L012（和光純薬工業）を使用した化学発光解析を行った。³³⁾ 仔魚 1 尾を 96 穴ホワイトプレートの 1well に 175 μI の海水とともに収容し、直ちに 30 分間の化学発光を TR717 Microplate Luminometer（Applied Biosystems）で測定した。L012 は測定開始から 2 分後に終濃度 0.5 μM になるように付属のインジェクターにより添加した。

高感度光量子顕微鏡による観察 仔魚の ROS 産生の場所を特定するため、微弱な化学発光を検出可能なリアルタイム CCD カメラ（浜松ホトニクス）を搭載した高感度光量子顕微鏡を用いた観察を行った。³⁴⁾ 仔魚をスライドグラス上に乗せた後、10 μM の L012 を添加し直ちに暗黒下で 1 分間の撮影を行った。

抗生物質添加 仔魚の ROS 産生の目的について知見を得るため、仔魚の ROS 産生レベルに対する抗生物質の効果を調べた。100 $\mu\text{g/mI}$ のペニシリン G カリウムと硫酸ストレプトマイシンで 24 時間処理後、化学発光を測定するとともに、Marine agar2216 培地を用いた CFU 法³⁵⁾で飼育水中の細菌数を計数した。

結 果

Fig.9 に示すように、6 魚種のふ化仔魚（0 日令）はいずれも化学発光を示し、これらは 100 U/ml の SOD 添加により明らかに抑制された。また 30 分間の化学発光のパターンと発光強度のピーク値は魚種によってそれぞれ大きく異なっていたが、ピーク値を比較するとこれらの魚種の中では、オニオコゼが極端に高レベルであった。

次に、それぞれの魚種について成長に伴う ROS 産生量の変化を 30 分間発光強度の積算値に基づき Fig.10 に示した。魚種により変化のパターンは大きく異なり、カサゴとメバルの ROS 産生レベルは 2 日令から徐々に増加し始め、10 日令ではふ化時の 90 倍以上に達した。10 日令におけるオニオコゼ、カサゴ、メバル、マハタ、トラフグ、マダイの積算化学発光値はそれぞれ 92,498, 9,703,570, 3,987,010, 33,094, 33,307, 44,339 であり、魚種によるレベルの差は非常に大きいことが分かる。カサゴ、メバルにおいて成長に伴う化学発光レベルの著しい増加が見られた一方で、マハタ、トラフグ、マダイでは目立った変化は観察されず、少なくとも 10 日令までは低いレベルに止まった。また 0 日令のレベルが 6 魚種の中で最も高かったオニオコゼにおいては、その後減少する傾向さえ見えた。

Fig.11 に示すように比較的集中した化学発光が異なるステージのメバル仔魚の頭部周辺に検出された。カサゴ、オニオコゼ仔魚でも頭部周辺に特に強い発光が検出された。これらの化学発光は SOD（100 U/ml）の添加により抑制された。一方、発光レベルの低いトラフグにおいてはメバル、カサゴに見られるような発光の集中はなかった。

ペニシリン G カリウムおよび硫酸ストレプトマイシンで 24 時間処理後、Marine agar2216 培地を用いたコロニー法で計数した飼育水中の細菌数は劇的に減少した。付随して仔魚の ROS レベルの減少が観察された。さらに仔魚の生残数が対照区に比べ抗生物質添加区ではほぼ 2 倍になった（Fig.12）。

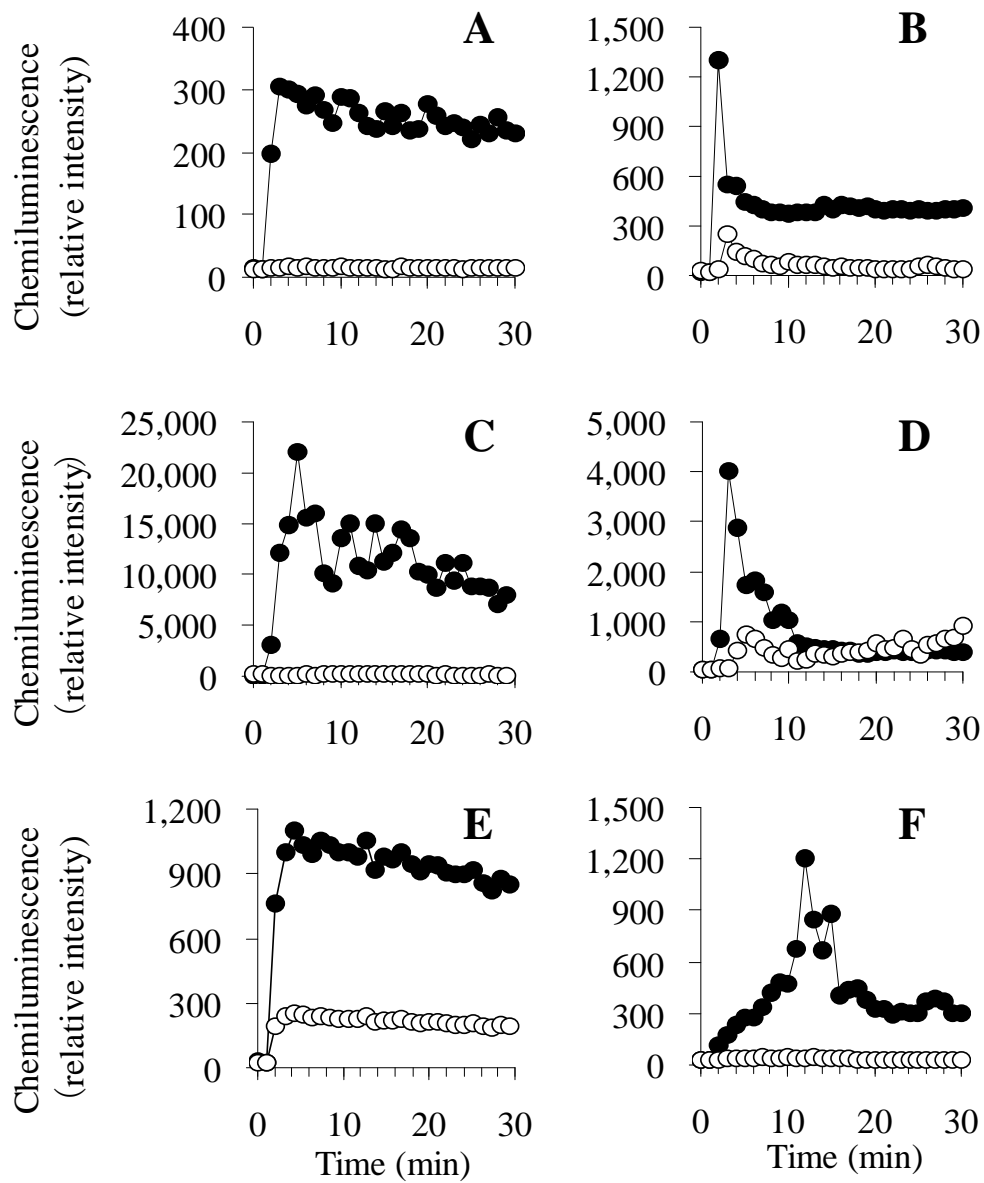


Fig.9 Patterns of L012-mediated chemiluminescence responses of 0 day post-hatch larva of marbled rockfish (A), black rockfish (B), devil stinger (C), sevenband grouper (D), tiger puffer (E), and red seabream(F).

Open circle, + SOD (final 50 U/ml for devil stinger or 100 U/ml for others);

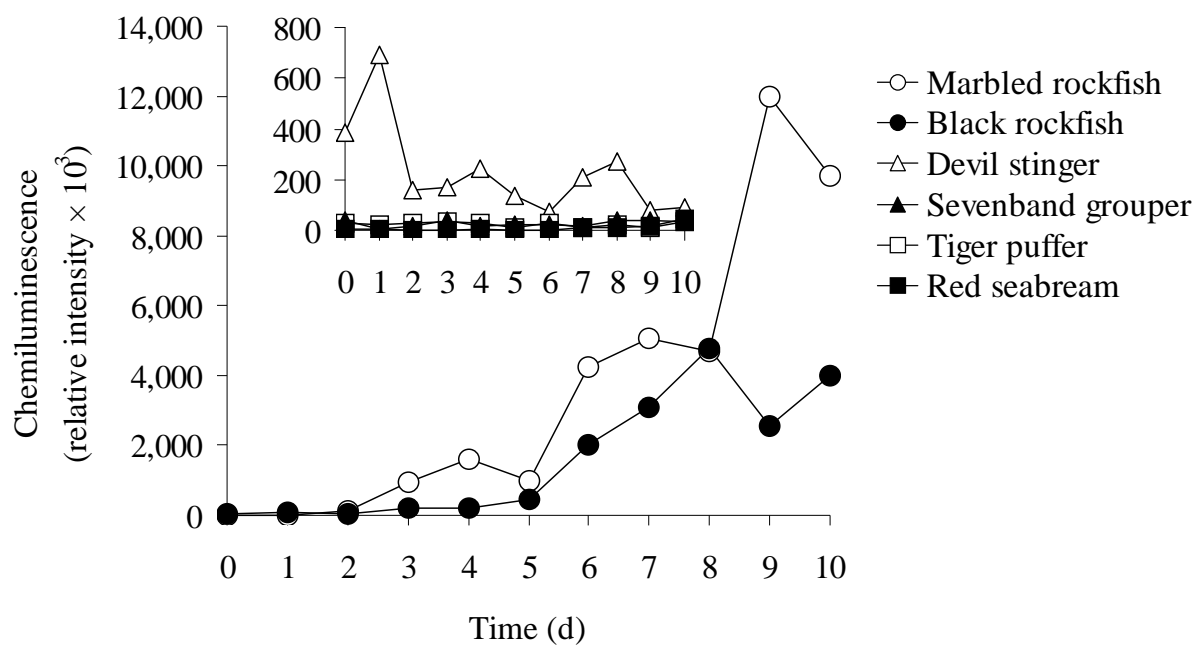


Fig.10 Time course of chemiluminescence response levels of larvae of six species during early development from 0 to 10 days after hatching. Each value represents the mean of 10 specimens.

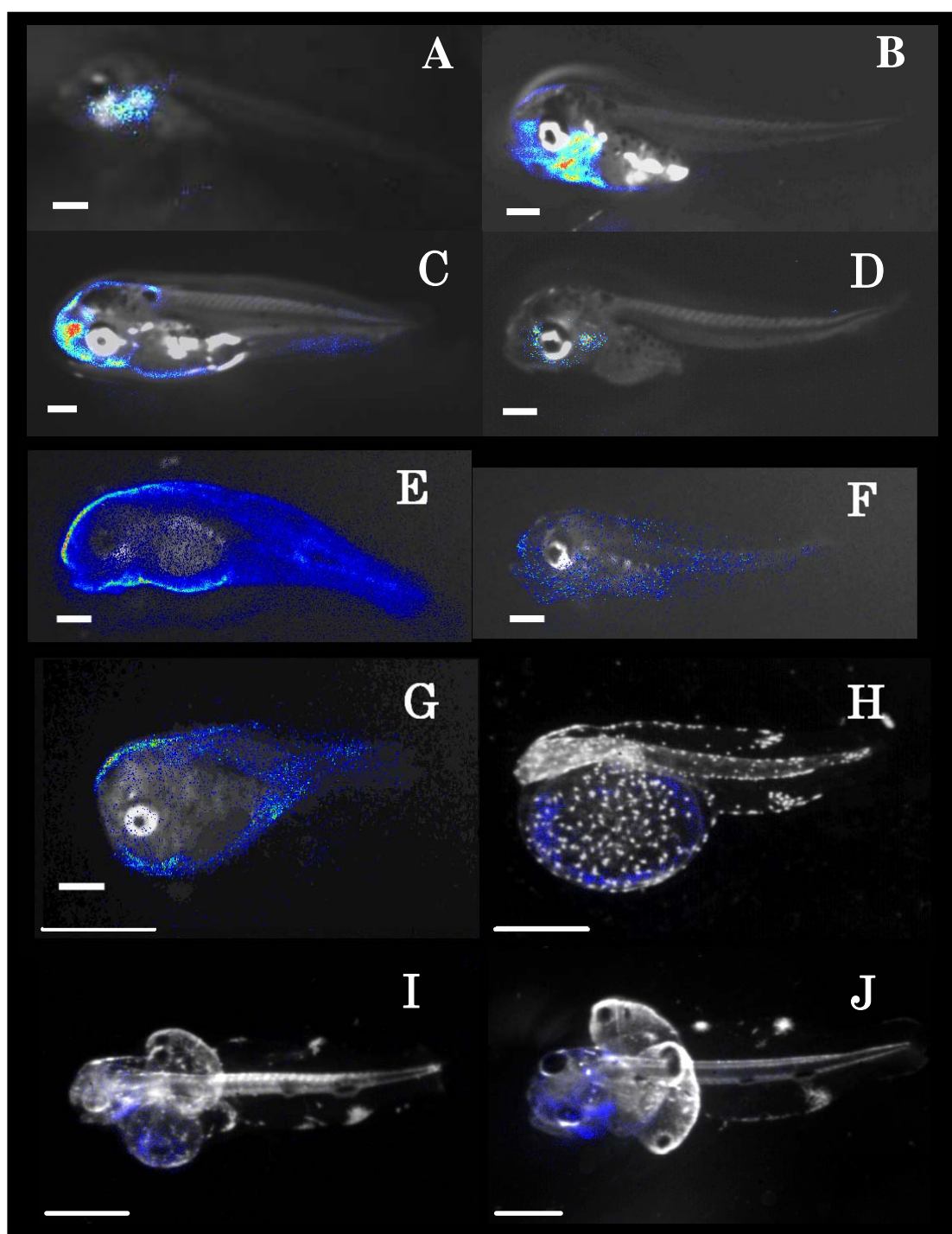


Fig.11 Location of ROS generation in several marine fish larvae. Black rockfish(A),(B),(C),(D), Marbled rockfish(E), (F), Tiger puffer(G), Devil stinger(H), (I), (J). (D),(F): In the presence of SOD. Each bar indicates 500μm.

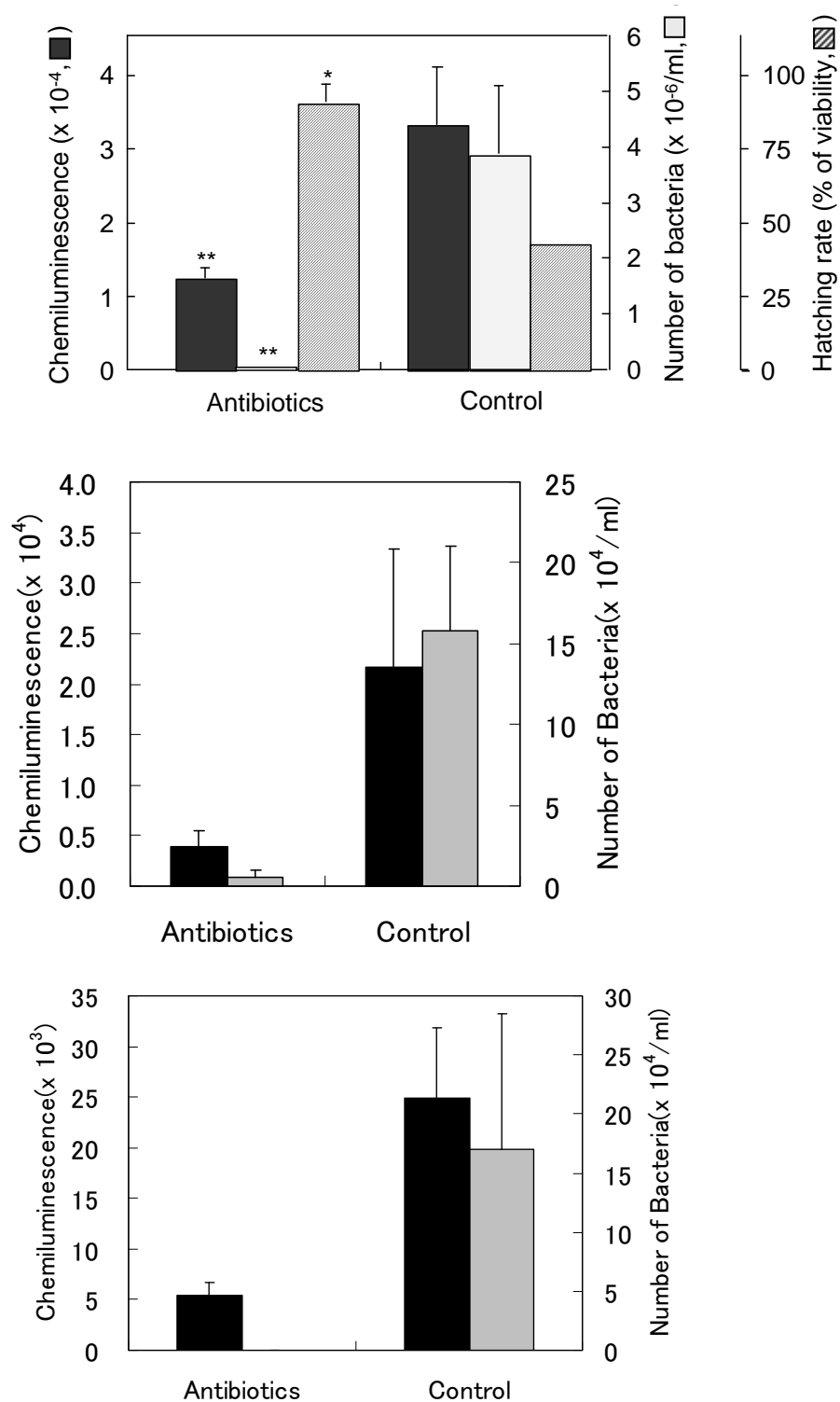


Fig. 12 Effects of antibiotics on the number of bacteria in rearing seawater, and chemiluminescence response of several marine fish larvae.

考 察

Fig.9 に示したように 6 魚種の仔魚はいずれも特別な刺激や誘発のない通常の飼育条件下で ROS を産生していることから、少なくとも今回測定した魚種においては ROS 産生は一般的な生物学的性質である可能性がある。また、それらの化学発光はいずれの魚種でも SOD の添加により顕著に抑制されたことから、仔魚の産生する ROS は主としてスーパーオキシドであると考えられる。このことは高感度光量子顕微鏡による観察において SOD 添加により発光が顕著に抑制されたことから裏付けられる。

化学発光のレベルが魚種により大きく異なることの正確な理由は明らかではないが、それぞれの魚種における ROS 産生システムの異なる生物学的特徴を反映している可能性がある。

0 日令の仔魚サイズは約 2 mm のマハタから約 6 mm のメバルまで魚種により大きく異なっているが、ROS レベルと仔魚サイズに直接的な関連は見られない。また本研究における平均日間成長率はオニオコゼ 0.366 ± 0.033 mm, カサゴ 0.127 ± 0.033 mm, メバル 0.191 ± 0.005 mm, マハタ 0.079 ± 0.012 mm, トラフグ 0.078 ± 0.003 mm, マダイ 0.192 ± 0.019 mm であり、高レベルの ROS を産生するカサゴ、メバルの成長率が必ずしも他魚種より優れているわけではなかった。したがって、カサゴ、メバルが比較的高レベルの ROS を産生するのは、おそらく仔魚のサイズや成長率よりもむしろ、魚種の特性に由来するものであると考えられる。

興味深いのは、オニオコゼ、カサゴ、メバルではその他の魚種と比較して格段に高レベルの ROS が検出されたことである。これらの魚種はいずれも種苗生産初期に原因不明の大量へい死を起こすことで知られており、生残率は同一機関であっても生産回次によって大きくばらついている。対照的に、トラフグ、マダイは種苗生産における生残率はかなり安

定している。実際に国内の養殖用種苗は 100%人工種苗でまかなわれており、1 社で 100 万尾以上の種苗生産が既に行われている。一方、マハタについては種苗生産技術開発の歴史は浅く、現時点では生残率が低くかつ不安定な魚種の 1 つである。しかし、マハタの生残率が低いのはふ化仔魚のサイズが極めて小さく、エアレーション等に代表される物理的刺激に弱いこと、³⁶⁾体表の粘液が多いため水面の表面張力に捉えられると逃れられずへい死する、いわゆる「浮上へい死」を起こしやすいこと、³⁷⁾さらに内部栄養から外部栄養への転換期には卵黄をほぼ吸収してしまっているか、あってもその量がごく少ないなど、³⁸⁾ハタ類に特有の性質に起因する飼育の困難さ、および仔魚期に発症すると壊滅的な被害をもたらすウイルス性神経壊死症（VNN）の発生³⁹⁾に整理することができ、オニオコゼやカサゴ等の大量へい死が原因不明であるのとは根本的に異なる状況にあると考えられる。

以上のことから仔魚期における ROS 産生レベルは、特にオニオコゼ、カサゴ、メバルにおいては、原因不明とされる仔魚の大量へい死と何らかの関係があるかも知れない。現在、仔魚による ROS 産生の正確な理由は明らかではないが、例えば細菌のような環境中の要素が ROS 産生を刺激する最も可能性の高い候補であると考えられる。

貪食細胞における respiratory burst response は一般的に侵襲してくる病原体に対する防御の第一線において重要な機構だと考えられており、⁴⁰⁾ マクロファージや顆粒球は活性化された NADPH oxidase により ROS 産生することで侵襲してきた細菌を破壊する。⁴¹⁾

抗生物質を添加した実験の結果は、海産仔魚が特に侵襲性のバクテリアに対する防御の目的で ROS を産生し、さらに ROS 産生の活性は環境中の細菌に何らかの形で影響され、例えば環境中の細菌の減少がオニオコゼ仔魚の生残率向上を導くかもしれないという考えを支持している。高感度光量子顕微鏡による観察の結果、発光レベルの高いカサゴやメバルにおいては ROS 産生は仔魚の頭部領域で強い傾向が見られた。頭部は仔魚にとって特に主要な器官であることから、仔魚が防御の目的で ROS 産生することは容易に考えられる。

抗生物質の添加により細菌数の劇的な減少と同時に仔魚の化学発光レベルも減少した。

(Fig.12) この結果から、仔魚における ROS 産生はおそらく細菌等の侵襲から自らを守る生来の生体防御系の 1 つであると考えられる。しかし、環境中の細菌数や種類、また仔魚同士の個体間距離などが天然海域とは大きく異なると予測される飼育環境下においては ROS が本来の生体防御の役割よりむしろ、互いにとって有害な作用の原因となる可能性も考えられる。

魚類は環境水と密着しており、それらの水は大抵、あるレベルの細菌やウイルスを含んでいる。そのような境遇の中で魚類は攻撃してくる病原体から自身を守ることにより健康を維持している。生体防御の生来のメカニズムは魚類の感染症を避けるという生命維持に必要な役割を担っており、魚類の受精卵や仔魚は、このステージでは特異的免疫機構を持たないことから特に興味深い。この点に着目すると、以下のような興味深い報告がある。ふ化後 2 週間のアトランティック・サーモン仔魚へ病原細菌の攻撃試験を行った場合、死亡率は 8%に止まる。成長によって感受性が高くなり、ふ化後 4 週間での攻撃試験では死亡率は 13%，さらに 6 週間後では 60%に達した。⁴²⁾ これと類似したせつそう病耐性の増大が非常に若いステージのサケについても報告されている。⁴³⁾ これらの発見は、母親に由来する未同定の要素が病原菌攻撃に対して重要な防御となっており、また、それらの要素が成長に伴い減少することを示している。本研究により見出した ROS 産生システムはそのような防御的要素の 1 つである可能性がある。

前述したように、カサゴとメバルは他魚種よりも極めて高レベルの ROS を産生していた。これらの魚種はいずれも種苗生産期にしばしば原因不明の大量へい死を引き起こすことが知られている以外に、どちらも卵胎生魚である点で共通している。卵胎生は高度に特化した繁殖形式で、サメ類を含む多くの魚類、爬虫類、無脊椎動物で観察される。仔魚は浸透圧調整や内分泌系について母子関連しながら胎内でふ化、発育する。⁴⁴⁾ 卵胎生生物におけ

る母性効果の生物学的重要性に関する報告は少ないが、卵胎生魚であるグッピーの産出仔魚の海水適応能が成魚に比較して非常に高く、母性遺伝によりコントロールされることが報告されている。⁴⁵⁾ その他にも環境塩分が母親を媒体として子孫の塩類細胞の活性と塩分耐性を高め、子孫の海水適応を成功させるのに貢献しているとの報告がある。^{46,47)} これらの研究は卵胎生硬骨魚類において、母性要素が仔魚の新環境への適応に極めて重要な役割を演じていることを示している。⁴⁸⁾ したがって、カサゴ、メバル仔魚に見られる極端に高レベルの ROS 産生は、これらと同様に母親から遺伝される卵胎生魚に特徴的な性質である可能性がある。

第4章 オニオコゼ胚および仔魚による活性酸素産生

第1節 オニオコゼ胚による活性酸素産生

著者は前章においてカサゴ、メバルなど6種の海産魚類仔魚が特別な刺激のない通常の飼育条件下においても、比較的高いレベルのROSを産生しており、中でもオニオコゼのふ化仔魚が非常に高レベルのROSを産生していることを見出した。また、カサゴ、メバル、オニオコゼなどROS産生レベルの特に高い魚種においては、これら仔魚の産生するROSが、これまで原因不明とされている大量へい死に関与している可能性について示したところである。しかし、ROS産生の起源やその正確な理由については明らかでない。本研究ではふ化前の胚の段階におけるROS産生について基礎的情報を得るためオニオコゼの胚を用いて様々なラジカルスカベンジャーに対する応答について調べるとともに、卵の活性酸素産生系（NADPH oxidase）の構成要素についてウエスタンブロッティングによる発現解析を行った。

材料および方法

受精卵 オニオコゼは長崎県総合水産試験場の陸上水槽で養成されている親魚からの自然産卵または漁獲直後の天然魚を用いたLHRHaによる排卵誘導・人工授精³⁰⁾により得られた卵を用いた。

化学発光解析 ROSを検出するため、L012をプローブとした化学発光法を用いた。1または数粒の受精卵を100 μ lの海水とともに96穴ホワイトプレートのウェルに収容し、10 μ MになるようL012を加えた後、直ちにMithras LB940 マルチラベルレコーダー

(Berthold Japan Co.)にて測定を開始した。

高感度光量子顕微鏡による観察 受精卵の ROS 産生の場所を特定するため、微弱な化学発光を検出可能なリアルタイム CCD カメラ (浜松ホトニクス) を搭載した高感度光量子顕微鏡を用いた観察を行った。³⁴⁾ 受精卵をスライドグラス上に乗せた後、 $10\ \mu\text{M}$ の L012 を添加し直ちに暗黒下で撮影を行った。

各種ラジカルスカベンジャーの効果 オニオコゼ胚による ROS の種類および産生系に関する知見を得るため、様々なラジカルスカベンジャー作用を持つ試薬の効果を化学発光により検出した。Fig.17 に示す濃度で各試薬を添加したウェルに 10 粒の受精卵を収容して直ちに化学発光を測定し、30 分間の積算化学発光強度を対照区に対する百分率で比較した。

ウェスタンブロッティング ヒト好中球のチトクローム *b558* の大サブユニット (gp91phox) に対する一次抗体 (Upstate Biotechnology Inc.) を用いて 10 粒の受精卵から抽出したタンパク質のウェスタンブロッティングを行った。

結果と考察

Fig.13 に示すように、受精 1 日後の胚 10 粒は同程度の広がりを持って L012 による化学発光を示した。その一方で、飼育水単独では発光は検出されなかった。さらに、30 分間の積算相対発光強度に基づく化学発光と胚の数にはほぼ直線的な相関関係 (Fig.14) が見られたことから、それぞれの胚はほぼ同レベルの ROS を産生していることが示唆される。

また人工授精により採卵した同腹の受精卵と未受精卵を受精 6 時間後に測定した化学発光解析の結果を Fig.15 に示した。一般的に ROS 産生源となるマクロファージや顆粒球などが存在しないと考えられる桑実期の胚、さらに未受精卵でさえもが既に一定レベルの ROS を産生していることは非常に興味深い結果である。

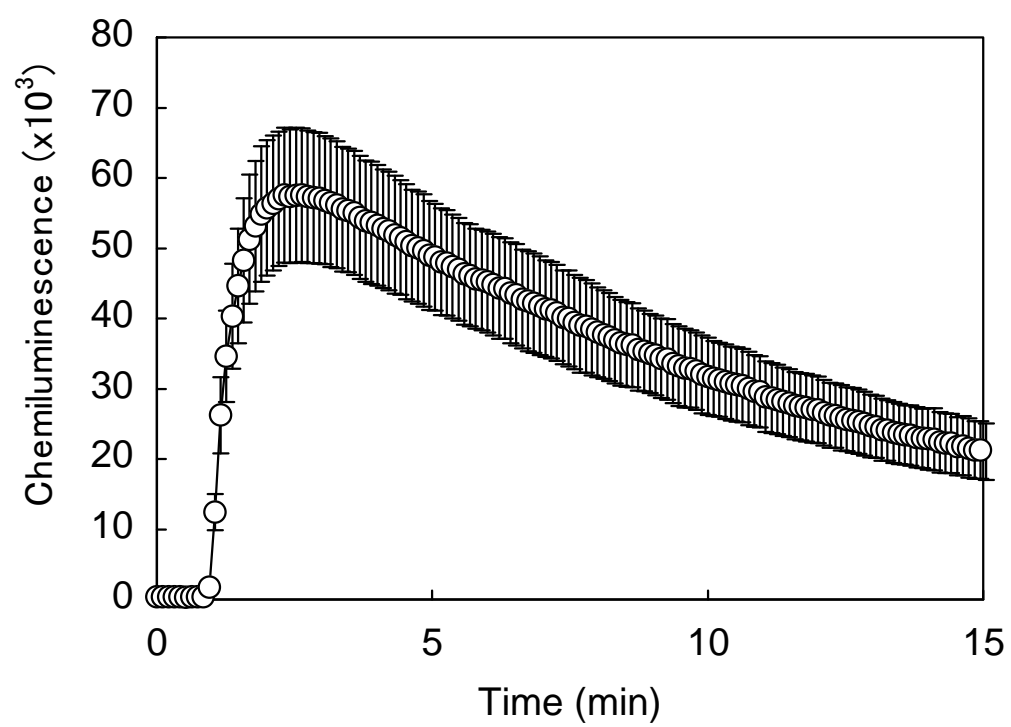


Fig.13 Time course of L012-mediated chemiluminescence response of the embryo of devil stinger.

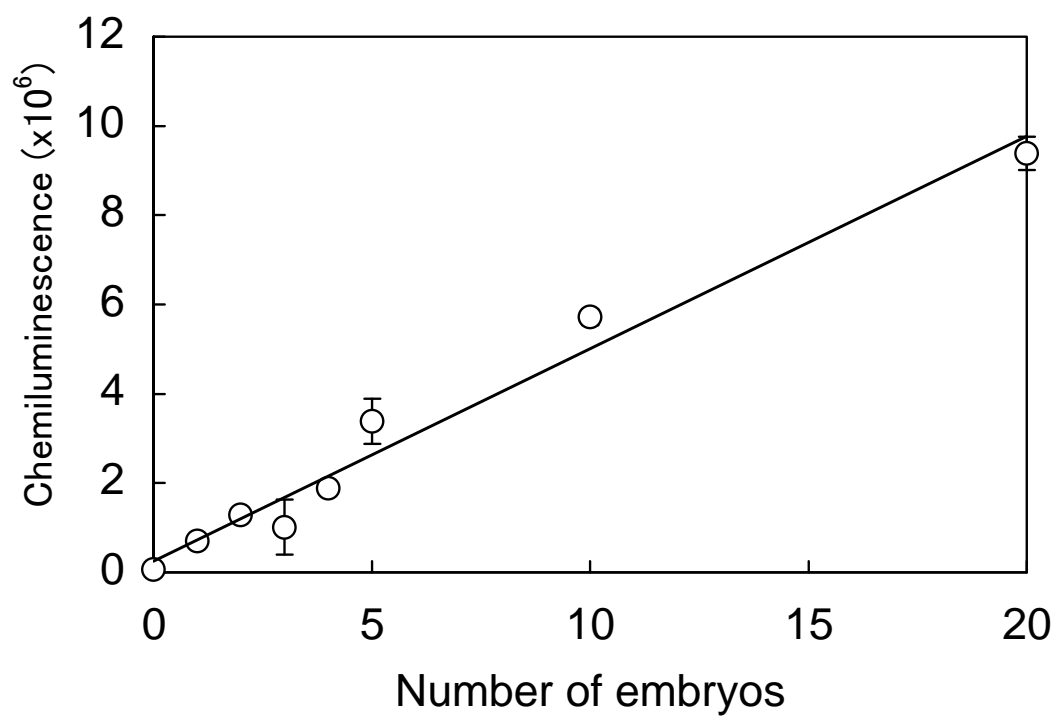


Fig.14 Relationship between the number of embryos and chemiluminescence response intensity.

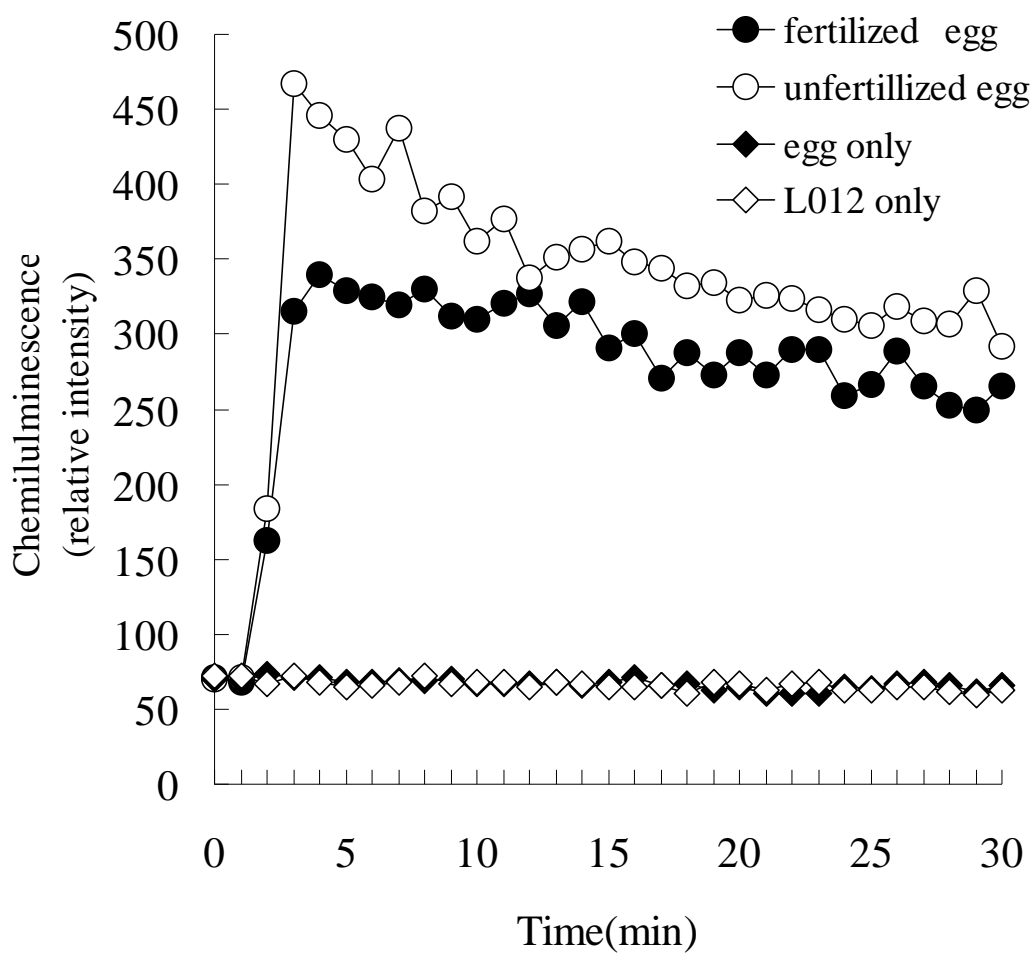


Fig.15 Time course of L012-mediated chemiluminescence response of the fertilized egg and unfertilized egg of devil stinger.

高感度光量子顕微鏡による観察の結果、L012 による発光が卵の表面に検出された (Fig.16) 一方で、L012 の添加なしでは発光は検出されなかった。

胚による化学発光の 80%近くが SOD (100 U/ml) の存在により消失した。一方で、カタラーゼ (100U/ml) は何の効果もなかった (Fig.17)。このことから、化学発光は主としてスーパーオキシドによるものと考えられる。SOD に加えて、さまざまなラジカルスカベンジャー、たとえば EGCG, アスコルビン酸, N-アセチルシステイン, アジド, マンニトールなどが程度は異なるものの胚の化学発光に阻害効果を示した。同じ濃度で比較するとこれらのラジカルスカベンジャーの中で EGCG はもっとも効果的であった。EGCG 等の茶カテキンを豊富に含む市販の緑茶抽出物は手ごろな価格であり、実際の飼育水槽への利用を考えたときコスト面でも実用性が高い。

NADPH oxidase の阻害剤である DPI⁴⁹⁾ は胚の化学発光に強力な阻害効果を示した。一方で、キサンチンオキシダーゼの阻害剤であるアロプリノール⁵⁰⁾ はほとんど何の効果も示さなかった。これらの結果から、マクロファージや顆粒球のような貪食細胞によく似た NADPH oxidase 様の酵素系が胚による ROS 産生で主として応答していることがわかった。さらに、抗ヒト好中球チトクローム *b558* 大サブユニット抗体を用いて、胚から抽出した水溶性タンパク質のウエスタンブロッティング解析を行い、マウスのマクロファージ系 RAW264.7 細胞に見られるものと同様の約 91kDa のメインバンドを検出した (Fig.18)。これらの結果は、NADPH oxidase 様の酵素系がオニオコゼ胚における ROS 産生源かも知れないとの考えを支持している。

魚類の胚発生期における ROS 産生に関して、ゼブラフィッシュ胚が PMA 刺激に応答して ROS を産生し、PMA 刺激により産生された ROS のレベルは胚の成長に応じて増加することが報告されている。⁵¹⁾ 貪食細胞の系統、たとえばマクロファージや顆粒球は一般には造血幹細胞から分化すると考えられているが、最近の研究では胎児のマクロファージが

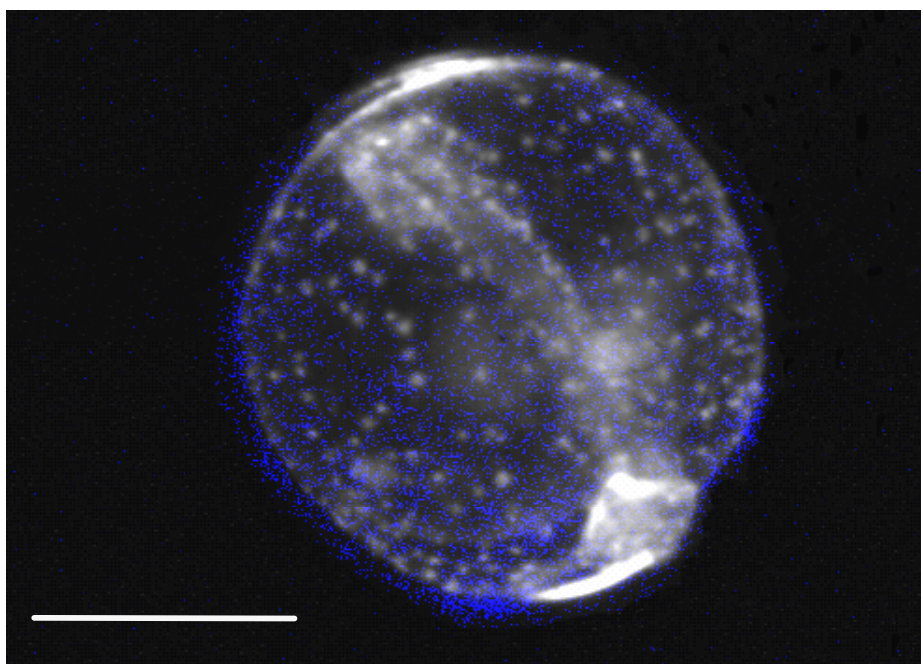


Fig.16 Location of ROS generation in embryo of devil stinger.

Scale bar indicates 500 μ m

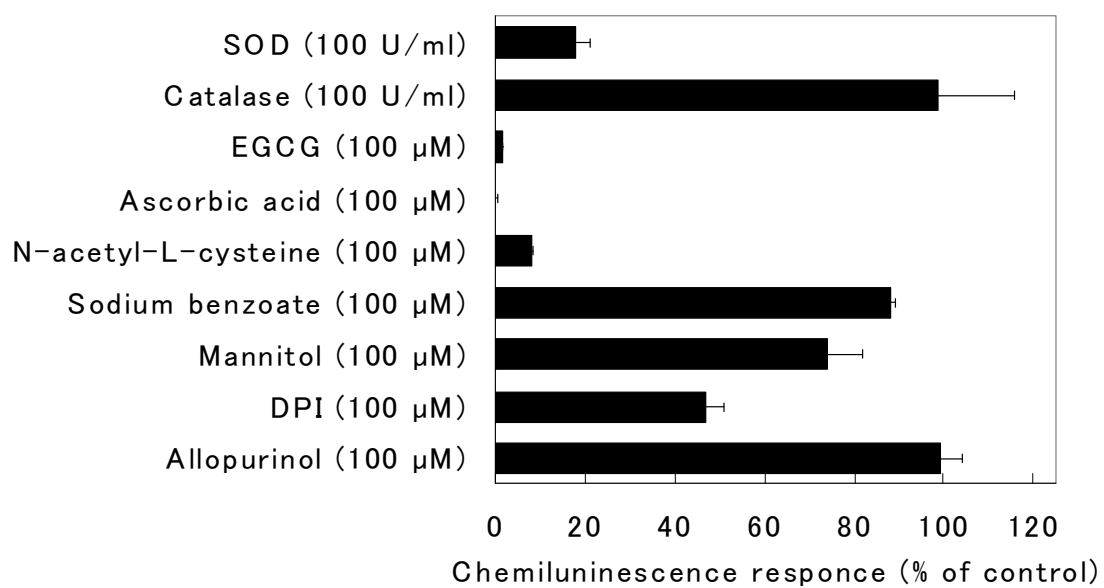


Fig.17 Effects of various agents on L012-mediated chemiluminescence response of the embryo of devil stinger.

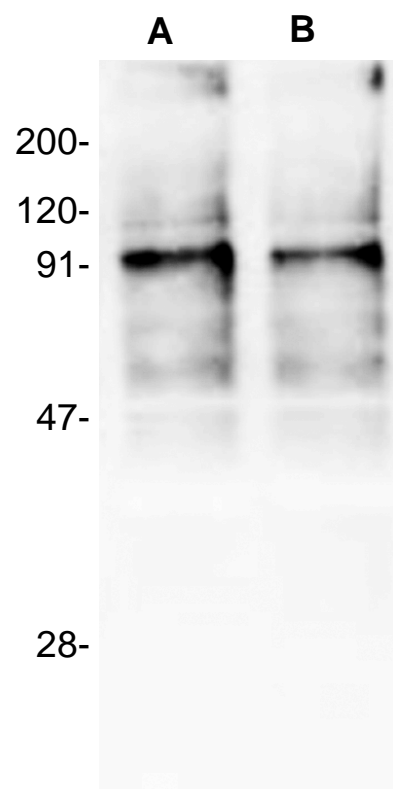


Fig.18 Immunoblotting analysis of the embryo proteins with the primary antibody against human neutrophil cytochrome *b558* large subunit (gp91phox) of NADPH oxidase.

Lane A, embryo; Lane B, RAW264.7 cells (mouse macrophage cell line).

成熟した単球が発達する以前に、卵黄に由来する未発達なマクロファージから分化することが観察されている。⁵²⁾ このように、もう1つの補助的なマクロファージ系統の存在がキンギョなどで示唆されている。⁵³⁾ ゼブラフィッシュ胚、特に発生初期の胚においては、卵黄にあるそのようなマクロファージ前駆細胞が ROS 産生の起源かもしれない。⁵¹⁾ しかしながら、オニオコゼ胚の場合、ゼブラフィッシュの胚と全く異なる重要な点は、オニオコゼ胚は特別な刺激または引金となるような刺激なしに一定レベルの ROS を産生しているという事実である。さらに未受精卵でさえも一定レベルの ROS が検出されている。オニオコゼの胚または卵細胞は、生体防御機構として未発達な、しかし重要な ROS 産生システムを持っているかもしれない。そして、その防御機構は、外因性の刺激がなくとも、すでにあるレベルの NADPH oxidase が活性化されている。そのような防御系は魚類に特別な、今までに報告例のない新規の自然免疫システムの可能性がある。⁵⁴⁾ ほとんどの魚類は非常に未発達な胚の状態でふ化するために、水環境中に生息しているさまざまな微生物に対する防御のために特に自然免疫系を発達させる必要があるのかもしれない。この点に関連して、コイでは胚期の機能的な自然免疫システムの存在が報告されている。⁵⁵⁾

現段階ではオニオコゼの胚発生期における ROS 産生についてマクロファージや顆粒球が関与している可能性を完全には無視できない。しかし卵表面における活性型 NADPH oxidase の存在や、そのような酵素系が、後の貪食細胞系列の起源と並行して存続する可能性は推測できる。オニオコゼ胚のふ化までの所要時間は水温にもよるが 24-30 時間である。そのような短時間の胚発生はオニオコゼの特徴的な生物学的特性であり、この期間は普通の貪食細胞系が成熟するための時間としては短すぎると考えられるので、胚期が短いことは卵表面にそのような補助的な ROS 産生システムが存在することの有力な理由になるかもしれない。今後は、卵表面の ROS 産生系の酵素学的側面、特に ROS 産生の活性と環境中のバクテリアとの関係を明らかにする研究が必要とされる。

第2節 へい死発生時の仔魚の活性酸素産生レベル

著者は第3章でカサゴ、メバルなど6種の海産魚類仔魚が特別な刺激のない通常の飼育条件下においても、比較的高いレベルのROSを産生しており、中でもオニオコゼのふ化仔魚が非常に高レベルのROSを産生していることを見出した。また、カサゴ、メバル、オニオコゼなど産生レベルの特に高い魚種においては、これら仔魚の産生するROSが、これまで原因不明とされている大量へい死に関与している可能性について示したところである。しかし、実際のへい死発生時にROSがどのような挙動を示すかについては明らかでない。本研究ではへい死発生と仔魚のROS産生レベルとの関連について基礎的情報を得る目的で、仔魚飼育と並行して化学発光解析を行い、大量へい死発生時の仔魚のROSレベルの変化について解析した。

材料と方法

仔魚飼育 オニオコゼは長崎県総合水産試験場の陸上水槽で養成されている親魚から自然産卵により得られた。受精卵はふ化直前まで1k/lアルテミア水槽で卵管理を行った後、1k/lポリエチレン水槽または12k/lコンクリート水槽に5000-23000尾/k/lの密度で収容した。注水は紫外線殺菌海水を換水率100%/日で行った。餌料はL型ワムシを市販の栄養強化剤で強化した後、仔魚の成長に応じて5~15個体/m/lになるよう1日1回給餌した。アルテミアは全長6mmを目安に給餌を開始し、仔魚の成長に応じて0.2~2個体/m/lを1日1回給餌した。水槽底に死魚が見えた際にはサイフォンによる底掃除を行い、回収した死魚を容量法もしくは全数計数により計数した。

化学発光解析 仔魚のROSを検出するために高感度ROS特異的プローブL012（和光純

薬工業)を使用した化学発光解析を行った。仔魚 1 尾を 96 穴ホワイトプレートの 1well に 175 μ l の海水とともに収容し、直ちに 30 分間の化学発光を TR717 Microplate Luminometer (Applied Biosystems) で測定した。L012 は測定開始から 2 分後に終濃度 0.5 μ M になるように付属のインジェクターにより添加した。すべての測定ごとに ROS 産生の刺激剤として PMA を 0.1 μ g/ml で添加したものも同時に測定した。1 回あたり 12 尾を測定し、最大および最小値を除いた 10 個体の平均値を代表値として採用した。

結果と考察

3 回の採卵により 6 例の飼育を行った。生残尾数の減少により飼育中止に追い込まれるほどの激しい大量へい死は起こらなかったが、6 例中 2 例の飼育で比較的大量のへい死が発生した。この 2 例は同一採卵日の受精卵を 12k/水槽と 1k/水槽に収容して行った飼育である。へい死状況はいずれも 12~15 日令にかけて摂餌不良、衰弱した仔魚が水流の強い場所で定位置できず流されたり、水面に頭を向けて立ち泳ぎをする「異常遊泳」が観察され、その後、14~20 日令にかけて比較的大量の死魚が観察された。各水槽の化学発光レベルの変化を Fig.19 に示す。大量へい死の発生した 2 水槽 (1-1 水槽および 12-1 水槽) だけが 12~15 日令にかけて化学発光レベルが急激に上昇しており、この時期は「異常遊泳」が観察された時期と一致している。目立ったへい死が発生せず順調な飼育経過をたどった他の 4 例では、このような化学発光レベルの上昇は見られなかった。Fig.20 に異常遊泳が観察された 12~15 日令の間の化学発光強度の積算値と、大量へい死が発生した 14~20 日令の間に底掃除により回収した累積死魚数との相関を水槽規模別に示した。プロット数は少ないが、水槽規模には関わりなく化学発光強度と死魚数には強い正の相関があると考えられる。

また PMA を添加すると ROS 産生レベルは極めて高くなり、オニオコゼ仔魚の ROS 産

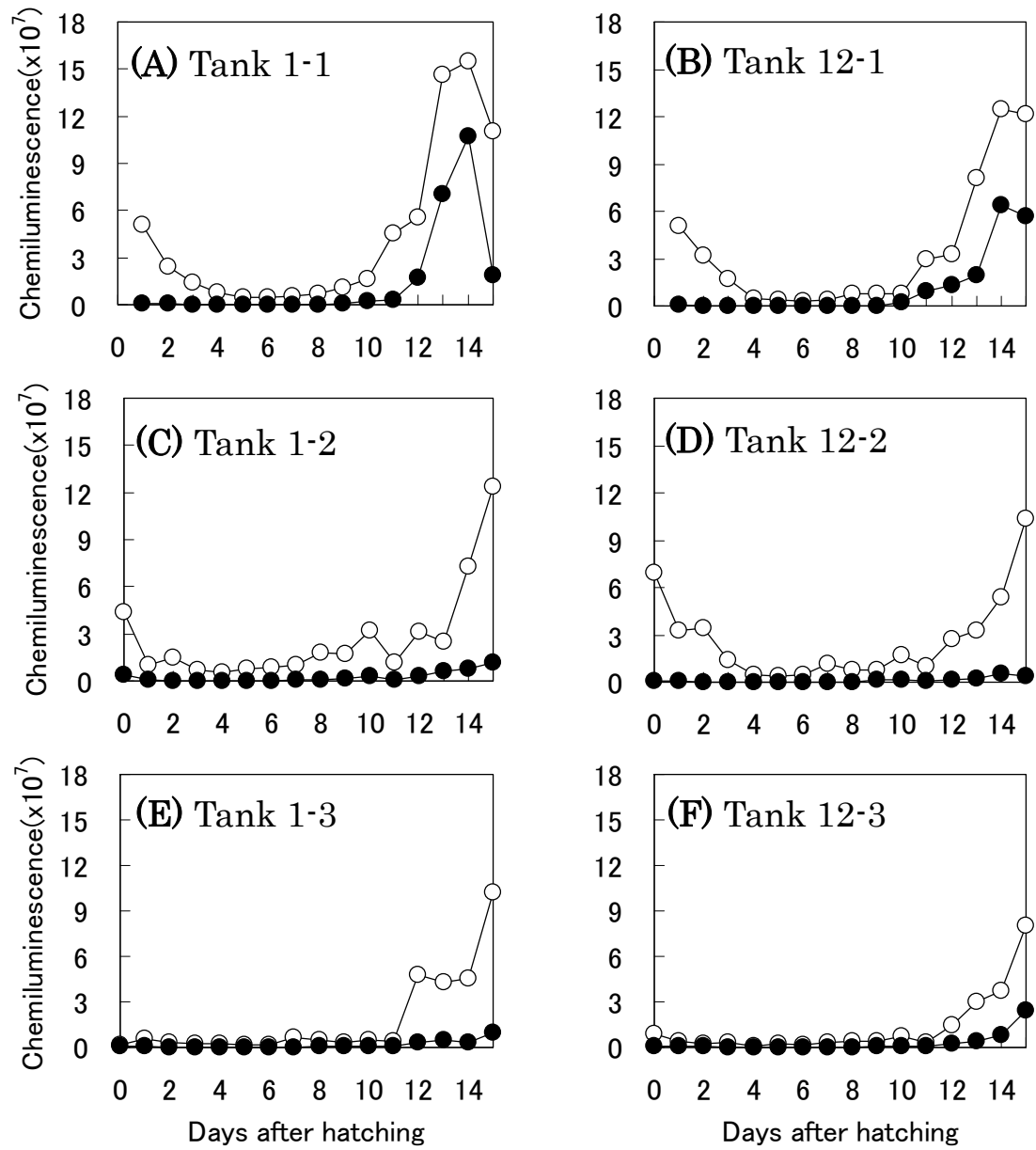


Fig.19 Time course of chemiluminescence response levels during the development from the fertilized egg to aged larvae. ●Control, ○+PMA 0.1 μ g/ml

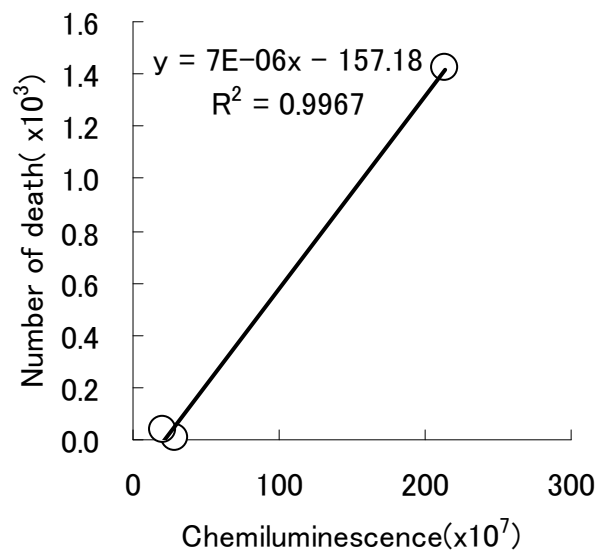
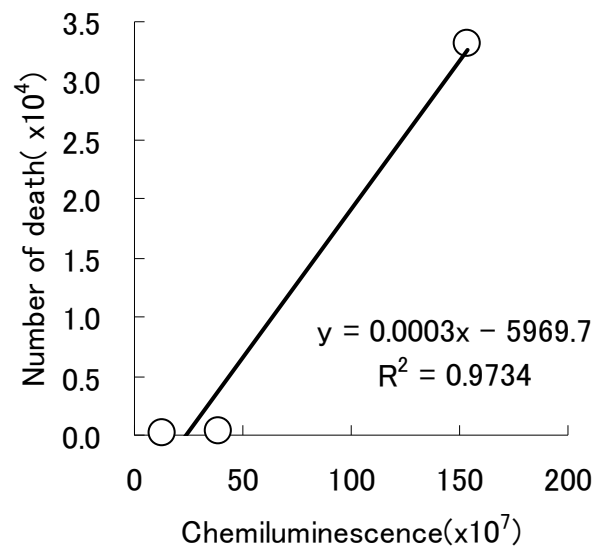


Fig.20 Relationship between the chemiluminescence response intensity and the number of death in the rearing tank.

Upper graph 12kl tank, lower graph 1kl tank

生システムは PMA により亢進されることが明らかとなった。Fig.19 に示すとおり PMA により亢進された ROS 産生レベルは、大量へい死発生の有無に関係なくいずれの水槽においてもよく似たパターンで推移し、発光のレベルはほぼ同程度であった。このことから PMA 存在下での ROS 産生量は、それぞれの発育ステージにおける仔魚の ROS 最大産生量に近いことが推測される。前述したとおり大量へい死の発生した 2 水槽においては、へい死発生前に先立って「異常遊泳」が観察されると同時に ROS レベルの急激な上昇が見られた。Fig.19 から分かるとおり、大量へい死の発生した 2 水槽で 12~15 日令にかけて上昇した ROS レベルは PMA による刺激を受け亢進した ROS レベルに近いことが分かる。すなわち異常遊泳が観察された時点の仔魚は、PMA による刺激と同様の刺激を飼育水槽内で既に受けており、そのために ROS レベルの急激な上昇が起こっていた可能性が考えられる。抗生物質添加により飼育水中の細菌数減少と同時に仔魚の ROS 産生レベルが著しく低下することから、ROS 産生に細菌が関与している可能性が既に示されている。このことから、大量へい死の発生した水槽で仔魚の ROS レベルが急上昇した要因として、水中に浮遊もしくは仔魚に付着している細菌は有力な候補として考えられ、たとえば細菌感染などをきっかけとした ROS の過剰産生が大量へい死の一因となっている可能性が考えられる。この点を確認するため、今後同一水槽でのへい死尾数と ROS レベルのモニタリングを行い、仔魚のへい死と ROS レベルとの直接的な関係を解析する研究が必要である。

第5章 ウェスタンブロッティングによる NADPH oxidase の検出

これまでの研究によりオニオコゼの胚における ROS 産生には NADPH oxidase が主として関わっていることが示されている。卵発生の過程で NADPH oxidase がどのように発現しているのかを調べることは興味深い。受精 12 時間後から化学発光解析と平行してヒトチトクローム *b558* の大サブユニットに対する一次抗体を使用した卵のウェスタンブロットによる NADPH oxidase の構成サブユニット gp91phox の発現解析を行った。

材料と方法

受精卵 長崎県総合水産試験場の 8k/l コンクリート水槽で採卵用親魚として養成中のオニオコゼ親魚から自然産卵により得た受精卵を用いた。受精卵は飼育水槽から換水率 1 k/h でオーバーフローする飼育水をゴース製のネットで受けて採集した。産卵の行われる夕刻から 1 時間おきに観察を行い、ネット内に初めて卵が確認された時間を受精後 0 時間として、以降、所定の時間にネット内から受精卵のサンプリングを行った。なお実験期間中の水温は 23.9～24.0℃であった。

受精後 12 時間から 36 時間まで 6 時間おきに浮上卵を採取し、直ちに L-012 を用いた化学発光量の測定を行うとともに、200～300 粒程度を 1.5 ml チューブに採り -30℃で凍結保存した。凍結したサンプルは、それぞれの受精卵をペッスルでつぶし、18000 × g, 3 分, 4℃で遠心した。上清を捨て、抽出バッファー (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% CHAPS, 1% プロテアーゼ阻害剤カクテル) を 200 ml 添加し、ピペッティングで溶解して 30 分間、4℃で静置した。

BCA 法によるタンパク質の定量 各試料は QuantiPro™ BCA Assay Kit (sigma)によりタ

ンパク質を定量化した。A 液 (sodium carbonate, sodium tartate, sodium bicarbonate in 0.2 M NaOH, pH 11.25.), B 液 (250 ml of a 4% (w/v) bicinchoninic acid solution, pH 8.5.) と C 液 (4% (w/v) copper(II) sulfate, pentahydrate solution.) を 25 : 25 : 1 の割合で混合したものを BCA 試薬とした。タンパク質のスタンダードを BSA で 0-100 µg/ml の範囲で調整した。試料と BCA 試薬を 1 : 1 の割合で混和し, 37°C, 2 時間恒温槽に静置した。その後, Multiscan® Spectrum ((株)Thermo Fisher Scientific) で 562nm の吸光度を測定した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) 試料液に 200µl EzApply (ATTO) を加え, 100°Cで 3 分間インキュベートすることにより SDS 化した。この試料溶液 20 µl を 12.5%アクリルアミドゲル PAGEL (ATTO) の上に充層した。泳動用緩衝液は 0.1%SDS を含む 25mM トリス-0.2 M グリシン緩衝溶液 (pH 8.3) を用い, 20 mA/ゲル の電流を流した。分子量測定用の標準タンパク質には, SDS-PAGE 用 SeeBlue® Plus2 Pre-stained standard ((株) invitrogen) を用いた。

ウェスタンブロッティング SDS-PAGE 後のゲルを PVDF 膜 (BIO-RAD 製, Immun-Blot™ PVDF Membrane) に転写した。Transfer buffer は, 25 mM Tris-HCl, 0.5 mM DTT, 0.02% SDS (pH 8.4) を用いた。泳動装置は, Mini Trans-Blot Cell システム (BIO-RAD 社製) を使用し, 約 1 時間泳動後, TBST で 2 分間洗浄した。ブロッキング溶液は 0.1% Tween 20, 1% スキムミルクを TBS に溶かしたものをうい, 1 時間室温でブロッキングした。一次抗体 (anti-gp91phox : Upstate Biotechnology Inc.) を 4°Cで一晩反応させた後, ブロッキング溶液で 5 分間の洗浄を 3 回行った。二次抗体 (Goat Anti-Rabbit IgG, HRP conjugate : Upstate Biotechnology Inc.) を室温で 1 時間反応させた後, ブロッキング溶液で 5 分間の洗浄を 3 回行い, その後 TBST で 2 分間の洗浄を 2 回行った。ECL plus 検出キット (GE ヘルスケア バイオサイエンス社) で 5 分間反応させ, Light capture (ATTO

社製)で検出した。発現量はバンドの濃さを ATTO CS Analyzer (ATTO 社製)により、12hpf を 1 とした相対値として数値化した。

結 果

オニオコゼ受精卵の化学発光量の経時変化 受精後 12 時間から 6 時間置きに受精卵に L-012 を添加し化学発光量を測定した。受精後 30 時間で発光量が急激に増加し、受精後 36 時間で減少した (Fig.21)。

Immunoblot 法による gp91phox 発現量の経時変化 受精後 12 時間から 6 時間置きに採取した受精卵について gp91phox の発現量を比較すると、受精後 30 時間で最も発現量が多くなり、受精後 36 時間で減少した (Fig.22)。

BCA 法によってタンパク量を一定にした後、イムノブロット法で gp91phox の検出を行ったところ、発光量の変化と一致して gp91phox の発現量の変化が見られた。

考 察

オニオコゼにおける免疫系の個体発生に関する報告は見当たらないが、本種は多くの海産魚と同様に分離浮性卵を産み、短期間で孵化することから、マダイと同様に初期発生、特に孵化前の胚の段階においてはリンパ系組織や特異的免疫機構は存在していないと考えられる。今回、このような免疫機構を持たないはずの受精後まもないオニオコゼ胚から ROS 産生とともに NADPH oxidase の構成要素である gp91phox が検出された。この結果は前述したふ化直前のオニオコゼ胚から gp91phox が検出されたのと同じであり、オニオコゼ胚における ROS 産生系が NADPH oxidase であることを裏付けている。

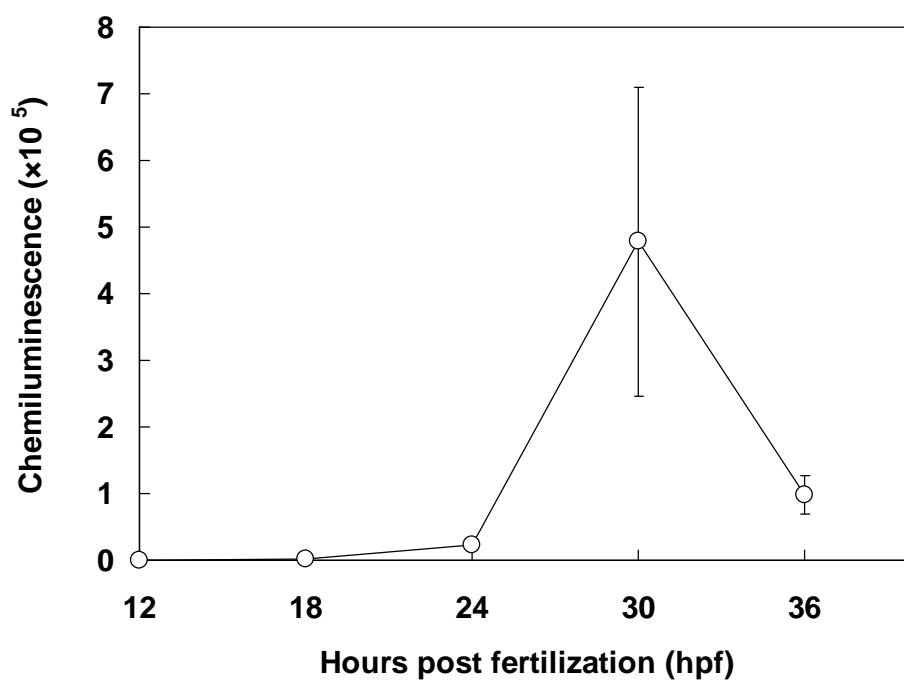


Fig.21 Time course of L012-mediated chemiluminescence response of the embryo of devil stinger during embryogenesis.

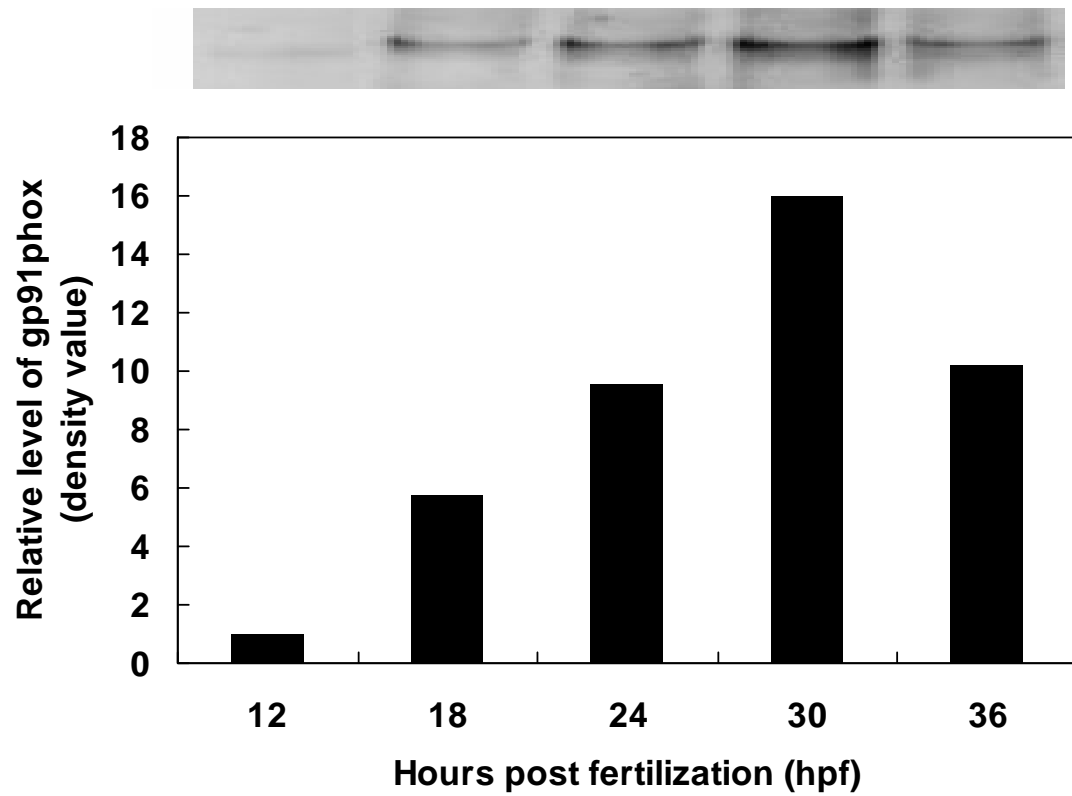


Fig22 Time course of expression level of gp91phox of NADPH oxidase by Immunoblotting analysis.

また、gp91phox の発現量が卵発生のステージにより変動し、発現量の変化と一致して ROS 産生による発光強度の変化が見られた。発生ステージにより発光量が増減する正確な理由は、現段階では明らかではないが、発光量の変化と gp91phox 発現量の変化パターンが一致したことから、少なくともオニオコゼ胚における活性酸素産生は NADPH oxidase 系によるものと考えられ、さらにこの NADPH oxidase が一般的な不活性型としてではなく、既に活性型として存在していることは非常に興味深い。

多くの海産魚は小さな分離浮性卵を大量に産み短時間で孵化するため、仔魚は極めて未熟な状態である。しかし、水中という微生物の生息にも適した環境で生活するため、それらの微生物に対する防御を行う必要があり、成魚とは異なる生体防御機構を持つことが考えられる。マダイについては親魚由来の抗体が仔魚に移行するものの孵化後数日で消失し、仔魚自身による抗体が産生されるまで 20~25 日ほどかかる。⁵⁶⁾ この間仔魚は抗体のない状態に置かれ、おそらく自然免疫系による防御が機能しているものと考えられる。またウナギは体表粘液に強力なレクチンを持ちレプトケファルス幼生の段階で既にその活性が認められる。しかし、この時期、リンパ系組織は極めて未発達で、胸腺は見られるものの、腎臓での白血球の造血、脾臓の分化・発達は見られず、体内での生体防御能の発達は遅れているとの報告⁵⁷⁾もあり、仔魚期の生体防御においては自然免疫系こそ重要であるとの考えを裏付けている。

オニオコゼが卵の段階で既に活性化された NADPH oxidase 系を持ち、常に活性酸素を産生し続けていることは、上述のような自然免疫系の重要性を考慮すると発生初期における特徴的な生体防御システムの 1 つとして機能している可能性が考えられる。

第 6 章 総合考察

著者はアスコルビン酸添加によるカサゴ仔魚のへい死抑制事例におけるアスコルビン酸の作用機序を考える中で、アスコルビン酸の持つ高い抗酸化作用に着目した。すなわち、飼育水に添加したアスコルビン酸のラジカルスカベンジャーとしての作用がカサゴ仔魚の過剰な活性酸素による生体へのダメージを抑えた結果、へい死を抑制していると推論した。しかし仔魚の活性酸素産生に関する情報は極めて少なく、また仔魚の生残率に対する活性酸素の関与について論じた報告も見当たらない。

以上の背景から本研究では海産魚類仔魚の活性酸素産生と初期生残率に関する基礎的知見の集積を試みた。

第 2 章ではオニオコゼおよびカサゴを用いて飼育水への抗酸化物質添加試験を行い、仔魚のへい死抑制効果について調べた。第 3 章では化学発光法によりオニオコゼ、カサゴのほかメバル、マハタ、トラフグ、マダイの計 6 魚種について仔魚期における活性酸素産生を検出し、その産生レベルを比較した。第 4 章ではオニオコゼの胚および仔魚による活性酸素産生について詳細に調べ、生残率との関係について考察した。第 5 章ではオニオコゼ胚期の活性酸素産生系についてウエスタンブロッティングを用いた解析により NADPH oxidase の挙動について調べた。

本研究によって得られた成果の概要を以下に要約する。

1. ラジカルスカベンジャー（抗酸化物質）として L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム（APM）または市販の緑茶抽出物「テアフラン 30A」および「テアフラン 90S」を用いて、カサゴおよびオニオコゼ仔魚の初期生残率に及ぼすこれら抗酸化物質の添加効果について飼育実験を行った。飼育水 1kℓあたり APM は 10g, 30A は 0.5g, 90S は 0.1g を添加することにより成長に悪影響を及ぼすことなくオニオコゼ、カサゴ仔魚の大量へい

死を顕著に抑制できた。

2. 緑茶抽出物を添加した実験において飼育水中の生菌数を Marine agar2216 および TCBS 培地を用いたコロニー法により調べた。いずれの培地でも、緑茶抽出物添加区と対照区との間に生菌数の差は見られず、試験区におけるへい死抑制効果は緑茶抽出物の主成分である茶カテキンの抗菌作用によるものではないことが明らかとなった。

3. オニオコゼ、カサゴほか 6 種の海産魚（メバル、マハタ、トラフグ、マダイ）について化学発光法により仔魚の活性酸素産生について調べた。いずれの仔魚も特別な刺激のない通常の飼育条件下で活性酸素を産生しており、これら魚種において活性酸素産生は一般的な生物学的特性であると考えられた。

4. SOD 添加により化学発光が顕著に抑制されることから、いずれの魚種においても活性酸素の種類は主としてスーパーオキシドであった。

5. 上記 6 魚種の活性酸素産生レベルは魚種により大きく異なっており、魚種による活性酸素産生システムの生物学的特徴を反映しているものと推察された。6 魚種の中ではカサゴ、メバル、オニオコゼが特に高いレベルを示したが、これらの魚種はいずれも種苗生産中に原因不明とされる大量へい死を起こすことで知られており、大量へい死に活性酸素が関与している可能性が考えられる。

6. ふ化前のオニオコゼ胚による活性酸素産生について詳細に調べた。オニオコゼは胚期に非常に高いレベルの活性酸素を産生していた。またヒト好中球のチトクローム *b558* のサブユニット(gp91phox)に対する抗体を用いたウェスタンブロットにより発生中の卵から NADPH oxidase の構成要素である gp91phox が検出された。このことからオニオコゼ胚にはすでに活性化された NADPH oxidase 系が存在し、活性酸素を産生していると考えられた。

7. オニオコゼ種苗量産試験を行った 6 飼育例について仔魚の活性酸素産生レベルのモニ

タリングを行った。全滅にはいたらなかったものの比較的大量のへい死が発生した 2 飼育例においては、実際にへい死が発生する直前から活性酸素レベルが急激に上昇しており、へい死発生の兆候を活性酸素産生量のモニタリングにより捉えることができたと考えられた。

8. 卵発生に伴う gp91phox の発現量の変化を調べた結果、受精 30 時間後付近に発現量のピークがあり、この間の活性酸素産生量の変化は gp91phox 発現量の変化と一致した。このことから少なくともオニオコゼ胚における活性酸素産生は NADPH oxidase 系によるものと考えられる。

9. 大量へい死を起こすことで知られる魚種で活性酸素産生レベルが高いこと、およびオニオコゼの飼育事例におけるへい死発生時期と活性酸素産生亢進時期の一致から、環境中の因子、たとえば細菌感染などをきっかけとした活性酸素の過剰産生が大量へい死の一因となっている可能性が考えられる。

10. この点を確認するため、今後同一水槽でのへい死尾数と活性酸素レベルのモニタリングを行い、直接的な関係についての研究が必要である。

以上延べたように本研究により、オニオコゼ、カサゴ、メバル、マハタ、トラフグ、マダイの仔魚がいずれも、特別な刺激のない通常の飼育条件下においても活性酸素種を産生しており、そのレベルは魚種によって大きく異なることが明らかとなった。

これまで魚類ではゼブラフィッシュの胚が PMA の存在下で ROS 産生することが報告されているが、本研究により見出された ROS 産生がゼブラフィッシュと全く異なる重要な点は、いずれも特別な刺激または引金となるような刺激なしに一定レベルの ROS を産生しているという事実である。海産魚の多くは非常に未発達な胚の段階でふ化するために、水環境中に存在する様々な侵襲性の微生物に対する防御の目的で非特異的な自然免疫機構を発達させることは重要だと考えられる。本研究で見出された ROS 産生は、そのような魚類に

特別な、今までにない新規の自然免疫システムの可能性がある。

また種苗生産期に原因不明とされる大量へい死を起こすことで知られるオニオコゼ、カサゴ、メバルにおいては、その ROS 産生レベルが特に高レベルであった。実際に比較的大量のへい死が発生したオニオコゼ飼育例において、へい死発生の数日前から「異常遊泳」の出現と同時に ROS 産生レベルの急上昇が観察された。この時期の ROS レベルは PMA 添加による刺激を受け亢進した ROS レベルと近いことから、異常遊泳が観察された時点の仔魚は、PMA 刺激と同レベルの刺激を既に飼育水槽内で受けていたことが推察される。一方で、抗生物質添加により飼育水中の細菌数が著しく減少すると同時に、仔魚の ROS 産生レベルも大きく低下する事実から、大量へい死発生時に観察された ROS レベルの急上昇の要因として飼育環境中の細菌は有力な候補の 1 つであると考えられる。

緑茶抽出物に含まれるカテキンの代表的な生理作用の 1 つは抗菌作用である。飼育水に添加したカテキンによる抗菌効果が仔魚のへい死抑制に効果的に作用することも予想されたため、オニオコゼの飼育実験において飼育水中の生菌数を比較した。その結果、Fig.3, 4 に示したように一般細菌およびビブリオ属細菌ともに緑茶抽出物添加区と対照区との間に差は見られなかった。すなわち緑茶抽出物添加により見られた仔魚のへい死抑制効果は、カテキンの抗菌効果によるものではないことが明らかとなった。本研究で使用した緑茶抽出物テアフランの製品資料によると、抗菌効果を期待した場合の使用量の目安はテアフラン 30A の場合、0.1-5%、90S の場合、0.05-0.3%とされている。飼育実験において想定されるそれぞれの最大瞬間濃度は 1ppm および 0.2ppm であるので、これらと比較すると本研究における添加濃度で抗菌効果が見られなかったのは当然の結果であると考えられる。

またカサゴ仔魚の大量へい死が飼育水へのアスコルビン酸添加により抑制されるとの報告²⁴⁾から本研究ではアスコルビン酸の抗酸化力に着目し、飼育水中でアスコルビン酸よりも安定的な誘導体である APM や、カテキンを主成分とする市販の緑茶抽出物を抗酸化物質

として飼育水に添加する実験を行い、いずれを添加をした場合でもオニオコゼおよびカサゴ仔魚の大量へい死を顕著に抑制できることを示した。ここで使用した APM（ビタミン C 誘導体）や緑茶抽出物（カテキン）はいずれも非常に抗酸化力の高い抗酸化物質であり、生体内で発生した活性酸素種を効率よく消去することができると考えられる。Fig.13 に示したようにオニオコゼ胚による化学発光が $100\mu\text{M}$ のアスコルビン酸や緑茶抽出物に高濃度で含まれるエピガロカテキンガレート（EGCG）の添加によりその 90%以上が抑制されたことから裏付けられる。現段階では抗酸化物質による仔魚のへい死抑制のメカニズムは不明であるが、ある種の細菌を含む飼育環境中の種々のストレスが仔魚の ROS 過剰産生をもたらし大量へい死のきっかけとなっているとすれば、抗酸化物質の添加によるへい死抑制効果について説明がつく。

今後、ROS と仔魚のへい死との直接的な関係をさらに確認することにより、種苗生産期における ROS 産生量のモニタリングによるへい死予察の可能性および抗酸化物質添加によるへい死防除技術の開発や、ROS レベルを指標とした魚種ごとの適正飼育な技術開発への応用など、種苗生産を計画的、安定的に行うための指標としての応用が可能と考えられる。

摘 要

オニオコゼおよびカサゴは長崎県沿岸域における水産上有用種であり、定着性が高く単価も高いことなどから栽培漁業の対象種として有望視され、近年、漁業者から種苗放流の要望が高い魚種である。放流用種苗を確保するため西日本を中心に多くの府県、機関で種苗生産の技術開発が現在行われている。しかし、いずれの魚種も 10 日令頃までの飼育初期に発生する大量へい死のために生産は必ずしも安定していない。へい死原因として卵質、感染症などが疑われているものの、明らかにされておらず、各地の栽培漁業センターなど生産ノルマを持つ機関においては深刻な課題であり、その解決が望まれている。

一方で、このようなカサゴの大量へい死が飼育水へのアスコルビン酸添加により抑制できるとの興味深い報告がある。筆者はこの事例におけるアスコルビン酸の作用機序を考える中で、アスコルビン酸の持つ高い抗酸化作用に着目した。すなわち、飼育水に添加したアスコルビン酸のラジカルスカベンジャーとしての作用がカサゴ仔魚の過剰な活性酸素による生体へのダメージを抑えた結果、へい死を抑制していると推論した。しかし仔魚の活性酸素産生に関する情報は極めて少なく、また仔魚の生残率に対する活性酸素の関与について論じた報告もほとんど見当たらない。

以上の背景から本研究では海産魚類仔魚の活性酸素産生と初期生残率に関する基礎的知見の集積を試みた。

1. ラジカルスカベンジャー（抗酸化物質）として L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム（APM）または市販の緑茶抽出物「テアフラン 30A」および「テアフラン 90S」を用いて、カサゴおよびオニオコゼ仔魚の初期生残率に及ぼすこれら抗酸化物質の添加効果について飼育実験を行った。飼育水 1kl あたり APM は 10g, 30A は 0.5g, 90S は 0.1g を添加することにより成長に悪影響を及ぼすことなくオニオコゼ、カサゴ仔魚の大量へい死を顕著に抑制できた。

2. 緑茶抽出物を添加した実験において飼育水中の生菌数を Marine agar2216 および TCBS 培地を用いたコロニー法により調べた。いずれの培地でも、緑茶抽出物添加区と対照区との間に生菌数の差は見られず、試験区におけるへい死抑制効果は緑茶抽出物の主成分である茶カテキンの抗菌作用によるものではないことが明らかとなった。

3. オニオコゼ、カサゴほか 6 種の海産魚（メバル、マハタ、トラフグ、マダイ）について化学発光法により仔魚の活性酸素産生について調べた。いずれの仔魚も特別な刺激のない通常の飼育条件下で活性酸素を産生しており、これら魚種において活性酸素産生は一般的な生物学的特性であると考えられた。

4. SOD 添加により化学発光が顕著に抑制されることから、いずれの魚種においても活性酸素の種類は主としてスーパーオキシドであった。

5. 上記 6 魚種の活性酸素産生レベルは魚種により大きく異なっており、魚種による活性酸素産生システムの生物学的特徴を反映しているものと推察された。6 魚種の中ではカサゴ、メバル、オニオコゼが特に高いレベルを示したが、これらの魚種はいずれも種苗生産中に原因不明とされる大量へい死を起こすことで知られており、大量へい死に活性酸素が関与している可能性が考えられる。

6. ふ化前のオニオコゼ胚による活性酸素産生について詳細に調べた。オニオコゼは胚期に非常に高いレベルの活性酸素を産生しており、発生中の卵から NADPH oxidase の構成要素である gp91phox が検出された。このことは、オニオコゼ胚にはすでに活性化された NADPH oxidase が存在し、活性酸素を産生している可能性が考えられた。

7. オニオコゼ種苗量産試験を行った 6 飼育例について仔魚の活性酸素産生レベルのモニタリングを行った。全滅にはいたらなかったものの比較的大量のへい死が発生した 2 飼育例においては、実際にへい死が発生する直前から活性酸素レベルが急激に上昇しており、へい死発生の兆候を活性酸素産生量のモニタリングにより捉えることができたと考えられ

た。

8. 卵発生に伴う gp91phox の発現量の変化を調べた結果、受精 30 時間後付近に発現量のピークがあり、この間の活性酸素産生量の変化は gp91phox 発現量の変化と一致した。このことから少なくともオニオコゼ胚における活性酸素産生は NADPH oxidase 系によるものと考えられる。

9. 大量へい死を起こすことで知られる魚種で活性酸素産生レベルが高いこと、およびオニオコゼの飼育事例におけるへい死発生時期と活性酸素産生亢進時期の一致から、環境中の因子、たとえば細菌感染などをきっかけとした活性酸素の過剰産生が大量へい死の一因となっている可能性が考えられる。

10. この点を確認するため、今後同一水槽でのへい死尾数と活性酸素レベルのモニタリングを行い、直接的な関係についての研究が必要である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり，終始懇篤なる御指導とご鞭撻を賜りました長崎大学大学院生産科学研究科 小田達也教授に深甚なる感謝の意を表します。また本論文について御助言と御校閲の労を賜った長崎大学大学院生産科学研究科 原研治教授，金井欣也教授，水産学部 山口健一准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただくとともに，御理解と御支援を頂いた長崎県総合水産試験場長 池田修二氏をはじめ池田義弘氏，安元進氏，濱口博彦氏，小坂安廣氏ほか長崎県総合水産試験場ならびに水産部，科学技術振興課の方々に感謝します。

さらに本研究を進めるにあたり様々な場面で御協力を頂いた長崎県総合水産試験場種苗量産技術開発センター魚類科職員の皆様，また長崎県産業振興財団 コア研究室の皆様に感謝申し上げます。

本研究に際し御協力いただいた長崎県産業振興財団 中島琢自博士，長崎大学水産学部海洋生物物理化学研究室の倉智麻木氏，杉原慎氏，成瀬早矢加氏ほか研究室の学生の皆様に感謝いたします。

最後に本研究を始める端緒を与えて頂くとともに，研究の進行中から取りまとめに至るまで常に御助言・御議論等頂きました長崎県総合水産試験場魚類科 宮木廉夫博士に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 水産庁編. 平成 19 年版水産白書～我が国の魚食文化を守るために～. 東京. 2007
- 2) FAO Fisheries and Aquaculture Department. THE STATE OF WORLD FISHERIES AND AQUACULTURE 2006. Rome. 2007
- 3) 水産庁. 平成 17 年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国)～資料編～. 東京. 2007
- 4) 上野陽一郎. オニオコゼの成長指数について. 京都府立海洋センター研究報告 1993 ; 16 : 39-42.
- 5) 久門道彦, 西廣富夫. 異なる餌料条件下における 1 歳魚オニオコゼの加温飼育. 京都府立海洋センター研究報告 1999 ; 21 : 29-33.
- 6) 三木教立. オニオコゼ養殖に関する基礎的研究－I, 配合飼料による長期飼育. 日本海ブロック試験研究収録 1989 ; 15 : 1-9.
- 7) 尾串好隆. オニオコゼの飼育試験. 山口県外海栽培漁業センター報告 1994 ; 16 : 33-40.
- 8) 睦谷一馬. オニオコゼの種苗生産に関する研究. 栽培技研 1997 ; 26 : 1-7.
- 9) 清川智之, 佐々木正. オニオコゼ仔稚魚飼育における大量斃死軽減のための 2, 3 の試み. 栽培技研 2005 ; 32 : 5-13.
- 10) 渡邊新吾. カサゴ種苗生産における産仔時期と初期生残率の関係. 大分海水研調報 2004 ; 5 : 35-40.
- 11) 浦毅. カサゴ (楠泊). 平成 14 年度長崎県漁業公社事業報告書 2004 : 18-20.
- 12) 野元聡, 高野瀬和治, 外園博人, 中野正明, 松原中, 清水則和. 特産高級魚生産試験－Ⅱ(カサゴ). 平成 14 年鹿児島県栽培漁業センター事業報告書 2004 : 19-22.
- 13) 田口智也, 日高秀美. カサゴ種苗生産. 平成 14 年度・平成 15 年度宮崎県栽培漁業協会事業報告書 2005 : 91-94.

- 14) P. Prakash, G. P. Kumar, M. Laloraya, T. Hemnani, and M. S. Parihar. Superoxide anion radical generation as a temperature stress response in the gills of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis*: role in mucus exudation under elevated temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* 1998 ; **119C** (2) : 211-216.
- 15) D. R. Livingstone. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue Med.* 2003 ; **154**, 6 : 427-430.
- 16) Shuichi Adachi, Ken Kawamura, and Kazuo Takemoto. Oxidative damage of nuclear DNA in liver of rats exposed to psychological stress. *Cancer Research* 1993 ; **53** : 4153-4155.
- 17) Speare D. J., Carvajal V. and Horney B. S. Growth suppression and branchitis in trout exposed to hydrogen peroxide. *J. Comp. Pathol.* 1999. **120** : 391-402.
- 18) Mitchelmore C. L. and Chipman J. K.. Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquat. Toxicol.* 1998 ; **41** : 161-182.
- 19) Fessard V. and Livingstone D. R.. Development of Western analysis of oxidized proteins as a biomarker of oxidative damage in liver of fish. *Mar. Environ. Res.* 1998 ; **46** : 407-410.
- 20) Mitchelmore C. L., Birmelin C., Livingstone D. R. and Chipman J. K.. The detection of DNA strand breaks in isolated mussel (*Mytilus edulis* L.) digestive gland cells using the ' comet' assay. *Ecotox. Environ. Safety.* 1998b ; **41** : 51-58.
- 21) Abele-Oeschger D., Sartoris F. J. and Portner H. O.. Hydrogen peroxide causes a decrease in aerobic metabolic rate and in intracellular pH in the shrimp *Crangon crangon*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997 ; **117C** : 123-129.

- 22) Philp R. B.. Effect of pH and oxidant stressors (hydrogen peroxide and bleach) on calcium-induced aggregation of cells of the marine sponge *Microcoiona prolifera*. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997 ; **118C** : 347-351.
- 23) 虫明敬一. シマアジ親魚の産卵に伴って増殖するウイルス性神経壊死症 (VNN) 原因ウイルス (SJNNV) とその抑制対策. 水産増殖 2000 ; **48**(1) : 109-115.
- 24) 宮木廉夫, 荒川敏久, 松尾陽子. 平成 11 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 東京. 1999 ; 79.
- 25) 渡邊新吾, 三浦慎一, 尾上静正, 米田寛. 栽培漁業推進技術開発事業. 平成 12 年度大分県海洋水産研究センター事業報告 2001 : 85-90.
- 26) Pairat Kosutarak, Akio Kanazawa, Shin-ichi Teshima, and Shunsuke Koshio. Interactions of L-ascorbyl-2-phosphate Mg and oxidized fish oil on red sea bream juveniles. *Fisheries Science* 1995 ; **61**(4) : 696-702.
- 27) Tongjun Ren, Shunsuke Koshio, Shin-ichi Teshima, Manabu Ishikawa, Sachiro Yokoyama, Fady Raafat Michael and Orhan Uyan. The efficiency of L-ascorbic acid in micro bound diet for larval red sea bream(*Pagrus major*). *Aquaculture Science* 2006 ; **54**(4) : 561-566.
- 28) Raneva V. G. and Shimasaki H, Green tea catechins decrease lipid peroxidation in plasma and organs of C57BL/6J mice fed atherogenic diet. *Journal of Oleo Science* 2005 ; **54**(12): 641-648.
- 29) Frei B. and Higdon J. V., Antioxidant activity of tea polyphenols *in vivo*: Evidence from animal studies 2003 . *American Society for Nutritional Sciences* : 3275S-3284S.
- 30) Takushima M, Nozaki R, Kadomura K, Yasumoto S, Soyano K. Induced ovulation

- using LHRHa and artificial fertilization in devil stinger, *Inimicus japonicus*. *Fish Physiol Biochem* 2003 ; **28** : 521-522.
- 31) 安元進. メバルの種苗生産試験. 平成 14 年度長崎県総合水産試験場事業報告. 2003 : 66-69.
- 32) 安元進. メバルの種苗生産試験. 平成 15 年度長崎県総合水産試験場事業報告. 2004 : 72-74.
- 33) Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka R, et al. Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 1999 ; **271** : 53-58.
- 34) Mizuguchi, Y. Single photon counting. *Methods Mol. Biol.* 1998 ; **108** : 37Y-55Y.
- 35) Nakashima T, Kurachi M, Kato Y, Yamaguchi K, Oda T. Characterization of bacteria isolated from the sediment at coastal area of Omura bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolate. *Microbiol Immunol* 2005 ; **49** : 401-415.
- 36) 土橋靖史・栗山功・黒宮香美・柏木正章・吉岡基. マハタ種苗生産過程における仔魚の活力とその生残に及ぼす水温, 照明およびフィードオイルの影響. 水産増殖 2003 ; **51** : 49-54.
- 37) Yamaoka K, Nanbu T, Miyagawa M, Isshiki T and Kusaka A. Water surface tension-related deaths in prelarval red spotted grouper. *Aquaculture* 2000; **189**: 165-176.
- 38) 與世田兼三・浅見公雄・福本麻衣子・高井良幸・黒川優子・川合真一郎. サイズの異なる 2 タイプのワムシがスジアラ仔魚の初期摂餌と初期生残に及ぼす影響. 水産増殖 2003 ; **51** : 101-108.

- 39) 土橋靖史・栗山功・黒宮香美・柏木正章・吉岡基. マハタ種苗生産過程におけるウイルス性神経壊死症 (VNN) の防除対策の検討. 水産増殖 2002 ; **50** : 355-361.
- 40) Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000 ; **109** : 33-44.
- 41) Rongrungruang Y, Levitz SM. Interactions of *Penicillium marneffe* with human leucocytes in vitro. *Infect Immun* 1999 ; **67** : 4732-4736.
- 42) Lillehaug, A, Sevatdal, S, and Endal, T, Passive transfer of specific maternal immunity does not protect Atlantic salmon (*Salmosalar* L.) fry against yersiniosis. *Fish Shellfish Immunol.* 1996 ; **6** : 521-535.
- 43) Munro, A. L. S., and Hastings, T. S., Furunculosis. In “Bacterial Diseases of Fish, ” eds. Inglis, V. , Roberts, R. J., and Bromage, N. R., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1993 : 122-142.
- 44) Wourms, J. P., Grove, B. D., and Lombardi, J., The maternal-embryonic relationship in viviparous fishes. In " Fish Physiology XIB, " eds. Hoar, W. S., and Randall, D. J., Academic Press, New York ; 1998 : 1-119.
- 45) Shikano, T. and Fujio, Y, Maternal effect on salinity tolerance in newborn guppy *Poecilia reticulata*. *Fish. Sci.* 1998 ; **64** : 52-56.
- 46) Shikano, T. and Fujio, Y, Effects of the mother's environmental salinity on seawater tolerance of newborn guppy *Poecilia reticulata*. *Fish. Sci.* 1998 ; **64** : 10-13.
- 47) Shikano, T. and Fujio, Y, Changes in salinity tolerance and branchial chloride cells of newborn guppy during freshwater and seawater adaptation. *J. Exp. Zool.* 1999 ; **284** : 137-146.
- 48) Shikano, T., Genetic and physiological analyses on seawater adaptability of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Fish. Genet. Breed Sci.* 2000 ; **29** : 1-13.

- 49) Yea CM, Cross AR, Jones TG. Purification and some properties of the 45 kDa diphenylene iodonium-binding flavoprotein of neutrophils NADPH oxidase .
Biochem J 1990 ; **265** : 95-100.
- 50) Spector T, Hall WW, Porter DJ, Lambe CU, Nelson DJ, Krenitsky TA. Inhibition of xanthine oxidase by 4-hydroxy-6-mercaptopyrazolo[3,4-D] pyrimidine. *Biochem Pharmacol* 1989 ; **38** : 4315-4320.
- 51) Hermann AC, Millard PJ, Blake SL, Kim CH. Development of a respiratory burst assay using zebrafish kidneys and embryos. *J Immunol Methods* 2004 ; **292** : 119-129.
- 52) Shepard JL, Zon LI. Developmental derivation of early embryonic and adult macrophages. *Curr Opin Hematol* 2000 ; **7** : 3-8.
- 53) Belosevic M, Hanington PC, Barreda DR. Development of goldfish macrophages in vitro. *Fish Shellfish Immunol* 2006 ; **20** : 152-171.
- 54) Magnadottir B. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 2006 ; **20** : 137-151.
- 55) Huttenhuis HBT, Taverne-Thiele AJ, Grou CPO, Bergsma J, Saeji JPJ, Nakayasu C, et al. Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) innate immune system. *Dev Comp Immunol.* 2006 ; **30**(6) : 557-574.
- 56) Tanaka, T., Furukawa, K., Suzuki, Y. and Aida K., Transfer of maternal antibody from mother to egg may have no protective meaning for larvae of red seabream, *Pagrus major*, a marine teleost. *Fisheries Science* 1999; **65**(2): 240-243.
- 57) Suzuki Y. and Otake T., Skin lectin and the lymphoid tissues in the leptocephalous larvae of the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 2000; **66**(4): 636-643.

Summary

Studies on the Production of Reactive Oxygen Species (ROS) During the Early Development Stage of Various Marine Fish Species

Devil stingers (*Inimicus japonicus*) and marbled rockfish (*Sebastiscus marmoratus*) are economically important fish in Japan. These fishes have been expected to be profitable species for marine ranching because of their migratory habits and high retail prices. Some hatcheries have tried to establish seed stock, but they have not been able to achieve stable production because of cryptogenic mass mortality during the larval rearing stage. Rearing conditions, egg quality, feeding conditions, and diseases are suspected as causes of this; however, the precise reason for this mass mortality has yet to be elucidated. There has been a report that the survival rate of the marbled rockfish larvae was notably improved by the addition of ascorbic acid into the rearing tank. Based on the above report, I speculated that the improvement in the survival rate was a result of the antioxidant effects of ascorbic acid caused by excess ROS. There has been little research about the production of ROS by fish larvae, or about the involvement of ROS in the survival rate of larvae. Herein, I tried to accumulate an elementary knowledge about ROS production of various marine fish larvae, and to elucidate the effects of the ROS level on the survival rate during the early development stage.

1. To confirm an effect of antioxidant materials, such as L-ascorbic acid phosphate

magnesium (APM) and a catechin rich green tea extract, which are commercially available from Itoen(Ltd.), on the survival rate of devil stinger and marbled rockfish larvae, rearing experiments were performed. These materials dramatically decreased the mass mortality of the larvae without any negative effects on the growth. The effectual additive amounts per 1kl of rearing water were 10g of APM, 0.5g of Teaflan30A, and 0.1g of Teaflan90S, respectively.

2. I investigated the production of ROS utilizing chemiluminescence analysis on the larvae of 6 marine fish species: devil stinger; marbled rockfish; black rockfish (*Sebastes inermis*); sevenband grouper (*Epinephelus septemfasciatus*); tiger puffer (*Takifugu rubripes*); and, red seabream (*Pagrus major*). The larvae of these six marine fish species produced ROS under normal rearing conditions without extra stimuli or inducers. These results suggest that ROS generation is a common biological feature of at least the fish species tested in this study.
3. Since the addition of superoxide dismutase (SOD) resulted in a significant disappearance of chemiluminescence signals, the larvae of these six marine fish species primarily produced superoxide anions.
4. The larvae of these six marine fishes produce ROS to considerably different extents. The exact reason for these differences is unclear now, it might reflect the different biological characteristics of the ROS generation systems in the various fish species. The devil stinger, marbled rockfish, and black rockfish showed much higher levels of chemiluminescence responses than the others. Since it is known that the survival rate of these fish species are unstable because of sudden mass mortality during the larval rearing stage, the higher level of ROS production of these fish species may be

somewhat linked to this incidence.

5. I examined the ROS production of the devil stinger embryo. The embryo of the devil stinger produced a certain level of ROS; furthermore, when the soluble proteins extracted from embryos were analyzed by immunoblotting, using an antibody against human neutrophil cytochrome *b558* large subunit (gp91phox), a main band of approximately 91 kDa was detected in the cells of the mouse macrophage cell line RAW264.7. These results suggest that the devil stinger has an ROS generation system that is already activated at a fairly early stage of development, before the maturation of the usual immune system.
6. The ROS levels of devil stinger larvae in a rearing experiment for mass seed production were monitored utilizing chemiluminescence analysis during the initial 15 days. Although the larvae escaped extinction, outbreaks of mass mortality occurred two times out of six rearing experiments. In two experiments, the ROS levels surged for a while before increasing mortality. These results suggest that the mortality of larvae might be predictable by monitoring ROS levels during rearing.
7. The expression level of gp91phox was analyzed by immunoblotting analysis during embryogenesis of devil stingers. The variation pattern of gp91phox were coincident with the pattern of ROS generation, both the expression of gp91phox and ROS generation reached a peak at about 30 hours post fertilization.
8. The high ROS level was observed in the fish species prone to mass mortality; furthermore, increases of ROS generation coincided with mortality in the case of the devil stinger. These results demonstrate that an environmental factor, such as

infection with some kind of bacteria trigger over production of ROS, and excess ROS might cause mass mortality.